1re Année. — N° 2. (Trimestriel). Avril-Mai-Juin 1959

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE

ANNALES DE L'INSTITUT NATIONAL
DE LA
RECHERCHE AGRONOMIQUE

SÉRIE A bis

ANNALES DE PHYSIOLOGIE VÉGÉTALE



INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
7, rue Keppler - Paris

AVIS AUX LECTEURS

Des modifications importantes sont apportées pour l'année 1959 aux Annales de l'Institut National de la Recherche Agronomique, en vue de mieux adapter l'ensemble de ces publications aux besoins des lecteurs. D'une part, une série nouvelle vient d'être créée : la série A *bis*, consacrée à la Physiologie Végétale, qui paraîtra 4 fois par an. D'autre part, dans les autres séries, le nombre moyen de pages a été augmenté. Désormais, les Annales de l'Institut National de la Recherche Agronomique comprendront les séries suivantes :

Série A — **ANNALES AGRONOMIQUES.** — Agronomie générale et science du sol — couverture crème — 6 fascicules par an d'environ 120 pages.

Série A bis — **ANNALES DE PHYSIOLOGIE VÉGÉTALE.** — Couverture bleue — 4 fascicules par an d'environ 50 pages.

Série B — **ANNALES DE L'AMÉLIORATION DES PLANTES.** — Couverture verte — 4 fascicules par an d'environ 120 pages.

Série C — **ANNALES DES ÉPIPHYTIES.** — Couverture rouge — 4 fascicules par an d'environ 120 pages.

Série C bis — **ANNALES DE L'ABEILLE.** — Couverture ocre — 4 fascicules par an d'environ 80 pages.

Série D — **ANNALES DE ZOOTECHNIE.** — Couverture jaune — 4 fascicules par an d'environ 80 pages.

Série E — **ANNALES DE TECHNOLOGIE AGRICOLE.** — Couverture grise — 4 fascicules par an d'environ 120 pages.

(Voir en page 3 de la couverture les conditions nouvelles d'abonnement).

Les commandes d'ouvrages doivent être adressées au Régisseur des publications, 149, rue de Grenelle, Paris-VIIe.

Règlement : par chèque bancaire à l'ordre du Régisseur des publications, par virement postal à son compte courant : Paris 9064-43 ou par bons U. N. E. S. C. O.

INFLUENCE COMPARÉE DU TRAITEMENT VERNALISANT (TEMPÉRATURE BASSE) D'UN BLÉ D'HIVER ET D'UN BLÉ DE PRINTEMPS SUR LES ÉCHANGES GAZEUX RESPIRATOIRES APRÈS TRAITEMENT

PAR

Y. COÏC et Mme J. DURANTON
Station centrale de Physiologie végétale, Versailles

PLAN DU MÉMOIRE

I. — Introduction.

On entend par vernalisation l'action des températures basses sur des graines germées ou sur des plantes, provoquant ultérieurement la formation de fleurs qui, sans ces températures basses, n'aurait pas lieu du tout, ou aurait été plus ou moins retardée (WELLENSIEK (1)).

Le traitement vernalisant appliqué aux grains de blé d'hiver a pour effet de faire acquérir à ce blé le rythme de développement du blé de printemps. C'est pourquoi l'on emploie parfois le mot printanisation comme synonyme de vernalisation, lorsque celle-ci s'applique aux céréales d'hiver. Le traitement vernalisant modifie également la croissance lorsque la semence est mise après vernalisation dans des conditions favorables. Les processus anaboliques de la croissance sont liés intimement au méta-

bolisme énergétique et en particulier à la fourniture d'énergie d'origine respiratoire. Nous avons pensé que la mesure des échanges gazeux respiratoires pendant la germination, avant et après vernalisation, pourrait être une épreuve valable de l'action comparée du traitement vernalisant sur un blé de printemps (Fylgia) et sur un blé d'hiver (Cappelle).

II. — **Protocole expérimental.**

Après aseptisation (trempage dans de l'eau de Javel diluée et rinçage à l'eau stérile), les graines sont mises à germer à 15°.

Traitement à basse température : Après début de germination (apparition de la radicule), les grains de blé sont mis à une température de 1° (ou légèrement supérieure) pendant un temps variable, suivant les expériences.

Respiration : Elle s'effectue dans tous les cas à 15°. Les blés mis à « vernaliser » à 1° sont mis pendant un certain laps de temps (18 à 24 h) à la température de 15° avant les mesures respiratoires. Les échanges gazeux respiratoires sont mesurés par la technique de WARBURG, pendant 1 heure à 15° (l'appareil comporte un réfrigérateur). Nous opérons exactement à la même température que celle de germination pour que la température de respiration soit sûre et pour que l'équilibre de solubilité des gaz à l'intérieur du grain soit considéré comme acquis.

Lorsque nous opérons sur la totalité du grain avec gemmule et racines, nous utilisons 50 grains. Ils sont mis après début de germination (ce qui permet de réaliser des lots relativement homogènes), sur un petit panier grillagé s'adaptant à la fiole de Warburg d'assez fort volume, que nous utilisons. Lorsque la détermination est effectuée, ces paniers avec leurs grains sont remis dans le thermostat à 15° sur un milieu humide stérile. Une détermination s'effectue chaque jour jusqu'à ce que racines et coléoptiles atteignent environ 3 à 4 cm. Bien entendu, le volume du matériel dont on mesure la respiration est déterminé à chaque mesure.

Les respirations d'organes séparés, grains, tigelles, racines, ont été faites sur un moins grand nombre de grains (vingt) et dans de plus petites fioles de Warburg.

Exemple de mesure après vernalisation (sur 50 grains germés) :

Temps	Thermo-baromètre	Cappelle KOH	Cappelle sans KOH	Fylgia KOH	Fylgia sans KOH
0	151	150	151	150	150
15 min.	150	117 -32	147 -3	120 -29	147 -2
30 min.	150	84 -33	143 -4	90 -30	143 -4
45 min.	148	49 -33	138 -3	59 -29	139 -2
60 min.	148	16 -33	134 -4	29 -30	136 -3
1 h		-131	-14	-118	-11

III. — Résultats.

1° Echanges gazeux pendant la germination.

Les grains de blé de printemps (Fylgia) et de blé d'hiver (Cappelle) germent à 15° et la respiration de 50 grains avec tigelles et racines est mesurée chaque jour à la température de 15°. Le volume d'O_2 et de CO_2 est exprimé en mm³ par heure.

QR = quotient respiratoire ; temps 0 = mise en germination.

TABLEAU I

Jours de germination et taille	Fylgia			Cappelle		
	QO_2	QCO_2	QR	QO_2	QCO_2	QR
2 jours (début de germination)	218	212	0,96	314	302	0,96
3 jours : Fylgia en retard sur Cappelle. Cappelle : Coléoptiles 5 à 7 mm, racines 1,5 cm	458	435	0,94	426	403	0,94
4 jours : Coléoptiles 5 à 7 mm, racines 1,5 cm	818	770	0,94	668	634	0,94
5 jours : Coléoptiles 1 cm à 1,5, racines 2 à 3 cm	1 130	1 050	0,93	986	928	0,94
6 jours : Fylgia : Coléoptiles 2 à 2,5 cm, racines 3 à 3,5 cm. Cappelle : Coléoptiles 2 cm, racines 3 à 3,5 cm	1 340	1 240	0,92	1 242	1 137	0,92

Ces chiffres font ressortir l'accroissement plus fort de l'intensité respiratoire de Fylgia que de Cappelle :

Au départ de la germination, Fylgia est un peu en retard sur Cappelle, ce qui se traduit par une intensité respiratoire nettement moins forte, mais 24 heures après, Fylgia a rattrapé Cappelle et l'a même dépassé Cette augmentation d'intensité respiratoire s'accentue le jour suivant et cette différence se maintient ensuite (nous n'avons pas continué les mesures au delà du 6ᵉ jour en raison d'une part de difficultés techniques, mais surtout parce que, à partir d'une certaine croissance sur eau distillée, nous nous sommes demandés si certains facteurs limitants d'ordre nutritionel ne viendraient pas masquer l'effet que nous cherchons à mettre en évidence). Cette *différence d'accroissement de la respiration en fonction du temps* se traduit, ainsi que nous le voyons, par des différences de croissance : Fylgia rattrape et dépasse légèrement Cappelle.

Le quotient respiratoire passe pour les deux blés de 0,96 à 0,92.

2° Echanges gazeux après vernalisation.

Les résultats exposés ci-dessous correspondent à des expériences séparées où les deux blés ont été mis à vernaliser à une température voisine de 1° pendant des temps variables.

La respiration a été faite à 15°, après 18 à 24 heures de maintien à la température de 15° dans un thermostat ; temps 0 = sortie de vernalisation.

TABLEAU II

11 jours de vernalisation	Fylgia			Cappelle		
	QO_2	QCO_2	QR	QO_2	QCO_2	QR
1 jour : Fylgia : Coléoptiles 2 mm, racines 7 mm à 1 cm.. Cappelle : Coléoptiles 2 à 4 mm, racines 1 à 1,5 cm	470	459	0,97	567	510	0,89
2 jours : Fylgia, Cappelle : Coléoptiles 7 mm, racines 2 à 3 cm	760	724	0,95	906	817	0,90
3 jours : Fylgia : Coléoptiles 1,5 cm, racines 3 cm......... Cappelle : Coléoptiles 1 à 1,5 cm, racines 2 à 3 cm..	1 070	998	0,93	1 239	1 172	0,94

TABLEAU III

18 jours de vernalisation	Fylgia			Cappelle		
	QO_2	QCO_2	QR	QO_2	QCO_2	QR
1 jour : Fylgia, Cappelle : Coléoptiles 2 à 3 mm, racines 1 à 1,5 cm	569	533	0,93	602	546	0,90
2 jours : Fylgia : Coléoptiles 5 mm, racines 1,5 cm .... Cappelle : Coléoptiles 5 à 7 mm, racines 1,5 à 2 cm.	756	687	0,90	875	782	0,89
4 jours : Fylgia : Coléoptiles 3 cm, racines 3 à 3,5 cm..... Cappelle : Coléoptiles 3 cm, racines 4 cm	1 397	1 271	0,90	1 488	1 327	0,89

TABLEAU IV

20 jours de vernalisation	Fylgia			Cappelle		
	QO_2	QCO_2	QR	QO_2	QCO_2	QR
1 jour : Fylgia, Cappelle : Coléoptiles 2 à 3 mm, racines 1 cm	577	554	0,96	624	577	0,92
2 jours : Fylgia : Coléoptiles 5 mm, racines 2,5 à 3 cm .... Cappelle : Coléoptiles 5 à 7 mm, racines 2,5 cm	743	616	0,82	967	862	0,89
3 jours : Fylgia : Coléoptiles 10 mm, racines 3,5 à 4 cm ... Cappelle : Coléoptiles 1 à 1,5 cm, racines 3 cm.....	1 071	1 025	0,95	1 120	1 028	0,91

TABLEAU V

30 jours de vernalisation	Fylgia			Cappelle		
	QO_2	QCO_2	QR	QO_2	QCO_2	QR
1 jour : Fylgia : Coléoptiles 2 à 3 mm, racines 10 à 15 mm. Cappelle : Coléoptiles 2 à 3 mm, racines 5 à 7 mm.	385	443	1,15	394	394	1
2 jours : Fylgia : Coléoptiles 4 à 5 mm, racines 2 cm ..... Cappelle : Coléoptiles 4 à 5 mm, racines 1 à 1,5 cm.	623	588	0,94	679	609	0,89
3 jours : Fylgia : Coléoptiles 7 mm, racines 2,5 à 3 cm .... Cappelle : Coléoptiles 7 mm, racines 2 à 2,5 cm	829	748	0,90	1 031	811	0,78
4 jours : Fylgia : Coléoptiles 1 à 1,2 cm, racines 3 à 3,5 cm Cappelle : Coléoptiles 1 à 1,5 cm, racines 3 à 3,5 cm.	916	870	0,94	1 120	1 004	0,89
5 jours : Fylgia, Cappelle : Coléoptiles 2,5 à 3 cm, racines 4 cm.....	1 042	974	0,93	1 227	1 147	0,93

Nous constatons qu'*après vernalisation, la respiration de Cappelle est nettement plus intense que celle de Fylgia, alors qu'avant vernalisation elle lui était inférieure.*

En se référant aux mesures de respiration avant et après vernalisation pour une taille respectivement égale du coléoptile et de la racine, on peut dire que *le traitement de vernalisation n'a pas eu d'effet sur Fylgia et a eu un effet remarquable sur Cappelle* (comparer, par exemple, certains chiffres des tableaux I et III).

Si l'on compare les quotients respiratoires de Fylgia et Cappelle, il semble que la vernalisation ait eu pour effet d'abaisser le quotient respiratoire de Cappelle par rapport à celui de Fylgia pendant les premiers jours après vernalisation.

Lorsque la durée de vernalisation croît, le quotient respiratoire mesuré au temps « 1 jour » (1 jour après la mise à 15°) croît.

Les mesures des échanges gazeux des organes excisés : tigelles, racines, grains restant, de ces deux blés avant et après vernalisation, ne nous ont rien appris (ces dernières mesures sont entachées d'une grande variabilité). En conséquence, nous relatons seulement quelques chiffres nous donnant une idée de la part respective de ces divers organes dans la respiration globale. L'imprécision des mesures est beaucoup plus grande, car nous opérons seulement sur 20 grains, que chaque jour les organes excisés utilisés proviennent de lots différents, et aussi parce que l'exci-

sion et les manipulations des organes excisés peuvent conduire à une modification plus ou moins variable de la respiration.

Temps 0 = 4 jours après la mise en germination à 15° (pas de vernalisation) des grains de blé Cappelle.

QO_2 = mm³ d'O_2 par heure.

	QO_2 pour 20 grains			QO_2 par gramme de matière sèche		
	tigelles	racines	grains	tigelles	racines	grains
0 jour	62	90	54	4000	3800	67
2 jours	148	129	105	4450	3550	159
3 jours	221	169	96	3300	3150	154
4 jours	263	133	126	2900	2200	214

IV. — **Discussion.**

Les mesures de respiration après vernalisation nous montrent que la vernalisation a agi sur le blé d'hiver et non sur le blé de printemps. Cette action sur blé d'hiver s'est manifestée même pour des temps de traitement relativement faibles (11 jours).

Ce manque de réaction du blé de printemps au traitement vernalisant est bien connu : par exemple FRIEDBERG (2) montre que les blés de printemps Garnet et Marquis non vernalisés épient en même temps que les vernalisés correspondants.

L'augmentation de la respiration après vernalisation nous incite à penser qu'il doit y avoir une modification du chondriome de l'embryon. KONAREV (3) a dosé les acides ribonucléiques et désoxyribonucléiques des embryons de blé d'hiver et de blés de printemps, vernalisés ou non, au moment de l'apparition du coléoptile. Il trouve que la vernalisation a pour effet d'augmenter très fortement la concentration des acides ribonucléiques chez le blé d'hiver, alors qu'elle a peu d'action chez le blé de printemps. Les embryons de blé de printemps sont capables de former intensivement les acides ribonucléiques au moment de la germination sans être vernalisés. Les études histochimiques de KONAREV confirment ses analyses biochimiques et lui permettent de localiser l'accumulation de l'A. R. N. Quoi qu'il en soit, on peut associer étroitement l'accroissement de l'A. R. N. à l'accroissement de la respiration, l'un et l'autre étant localisés principalement dans le chondriome. L'importance de l'A. R. N. dans l'élaboration des protéines du cytoplasme, tout comme l'importance du métabolisme énergétique respiratoire dans l'anabolisme des jeunes tissus en croissance, nous font considérer l'un ou l'autre comme

des témoins importants de l'action de la vernalisation. Mais ce ne sont que des témoins, le processus intime ne pouvant, à notre connaissance, s'exprimer de façon concrète. L'opinion de LJUBIMENKO (4) nous séduit particulièrement : l'induction thermique et photopériodique consisterait en une accélération de tout le cycle de développement, accélération qui serait réalisée en retardant les divisions cellulaires et en accélérant la différenciation. KONAREV écrit : il est connu que l'embryon des variétés de printemps est davantage différencié que celui des variétés d'hiver. Nous avons remarqué, d'autre part, que lorsque l'on coupait toutes les tiges d'un blé d'hiver à l'épiaison (fin mai), d'autres talles se développaient avec une vitesse considérable et arrivaient à épiaison très rapidement. Cette possibilité de développement particulièrement accéléré avait été vraisemblablement préparée par la vernalisation des initiales de ces nouvelles talles pendant l'hiver, ainsi peut-être que par l'induction photopériodique.

Les modifications obtenues par le traitement vernalisant font acquérir au blé d'hiver les aptitudes qui déterminent un rythme de développement analogue à celui du blé de printemps.

V. — **Résumé.**

Nous avons mesuré les échanges gazeux respiratoires d'un blé de printemps (Fylgia) et d'un blé d'hiver (Cappelle) pendant la germination, d'une part sans qu'il y ait eu de traitement vernalisant, d'autre part après des temps variables de traitement vernalisant.

Sans traitement vernalisant, l'accroissement de la respiration (du QO_2) de Fylgia est nettement plus élevé que celui de Cappelle, pendant les premiers jours de germination à 15°. Après traitement vernalisant (température de 1°), c'est l'accroissement du QO_2 de Cappelle qui est le plus fort. En fait, de ce point de vue, le traitement vernalisant n'a pas eu d'action sur Fylgia, alors qu'il a eu une action très nette sur Cappelle. Ces résultats nous font penser que le chondriome a subi une modification profonde pendant le traitement vernalisant chez le blé d'hiver.

Les modifications obtenues font acquérir au blé d'hiver les aptitudes qui déterminent un rythme de développement analogue à celui du blé de printemps.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) WELLENSIEK (S. J.), DOORENBOS (J.) et ZEEVAART (J. A. D.). — L'action du froid dans le processus de la vernalisation. *Bull. soc. fr. Physio. vég.* **2**, 136-144, 1956.

(2) FRIEDBERG (M.). — La printanisation des blés. *C. R. Ac. Agric.*, **20**, 220, 1934.
(3) KONAREV (V. G.). — Influence de la jarovisation sur le comportement des nucléprotéides et des acides nucléiques dans les germes des céréales. *Biokhim*, XIX, **2**, 131-136, 1954.
(4) LJUBIMENKO, d'après DAVID (R.). — Facteurs de développement et printanisation des végétaux cultivés. Actualités scientifiques et industrielles, Hermann et Cie, 155, 1947.

ÉTUDE DE QUELQUES DÉVIATIONS DE MÉTABOLISME CHEZ LES PLANTES ATTEINTES DE MALADIES A VIRUS *(fin)*

PAR

C. MARTIN

Stations centrales de Pathologie Végétale et de Physiologie Végétale, C. N. R. A., Versailles.

VIII. — ÉTUDE SUR LES PIGMENTS ANTHOCYANIQUES

1° Introduction

Au cours de nos recherches sur l'accumulation d'acide chlorogénique, en fonction du temps, dans les germes de Pomme de terre, nous avons relevé des anomalies de pigmentation chez les plantes atteintes de maladies à virus. Les germes de plantes saines présentent une pigmentation régulière et intense, de couleur violette ou rose suivant la variété ; par contre, les germes issus de plantes porteuses de virus Y présentent une juxtaposition de plages irrégulières, les unes étant pigmentées, les autres ne l'étant pas. Ces zones sont souvent allongées en bandes ou stries ; mais dans le cas d'attaques graves, lorsque la plante héberge deux virus par exemple (X+Y), il peut ne pas y avoir de pigmentation du tout. La photographie n° 22 illustre bien ce phénomène et montre sa netteté.

L'altération de la pigmentation des fleurs chez les plantes atteintes de maladies à virus est un phénomène bien connu. BAWDEN (1950) (2) n'hésite pas à écrire que ce symptôme est une indication beaucoup plus spécifique de l'infection par une maladie à virus que les symptômes sur feuilles.

L'exemple le plus typique est certainement donné par la Tulipe. Chez cette plante, le virus 1 provoque une panachure irrégulière des pétales, qui se présente sous forme de larges stries blanches sur fond coloré. Ce phénomène, connu depuis très longtemps, fut appelé « Breaking » par les chercheurs de langue anglaise. Les producteurs hollandais deTulipes n'ont d'ailleurs pas hésité à faire une variété nouvelle, appelée « Rembrandt » d'exemplaires malades de la variété « princess Elizabeth ». Mais la Tulipe n'est pas le seul exemple de plante présentant une anoma-

lie de pigmentation lorsqu'elle est malade. La Giroflée (*Cheiranthus cheri*) atteinte d'un virus du Chou (Cabbage blackring virus), la Violette, l'Anémone, la Renoncule, le Glaïeul, la Primevère, le Tabac, le Cattleya, etc... ont des fleurs panachées lorsqu'ils hébergent certains de leurs virus respectifs.

Par contre, il ne semble pas que l'on ait jamais signalé de pigmentation anthocyanique anormale sur des organes aussi différents de la fleur que le sont les germes de Pomme de terre.

Étude comparée de la synthèse des anthocyanes chez les pommes de terre saines et malades.

Etant donné l'analogie de structure qui relie l'anthocyane aux phénols étudiés précédemment, il nous a paru intéressant d'étudier quantitativement la synthèse de ce composé en fonction de la quantité de virus chez les plantes malades.

Avant toute chose, il fallait déterminer la nature de l'anthocyane présente dans les germes de Pomme de terre de la variété Bintje.

1° Nature du pigment.

Ce pigment fut isolé suivant la technique de ROBINSON et ROBINSON (1931) (13) ; pour cela, 1 kg de germes de Pommes de terre ayant poussé à la lumière et présentant donc un maximum de pigmentation est broyé dans l'acide chlorhydrique normal. Le pigment est alors extrait plusieurs fois par un mélange alcool amylique (2 parts) et acétophénone (1 part), contenant un peu d'acide picrique (1 gr par litre de mélange). La couche organique séparée est filtrée, diluée avec de l'éther et extraite avec de l'acide chlorhydrique à 1 p. 100. La solution aqueuse est complètement libérée d'acide picrique par des extractions répétées à l'éther.

Puis les différents tests colorimétriques proposés par ROBINSON et ROBINSON (13) furent essayés avec cet extrait. Ces tests laissaient supposer que l'on avait affaire à la cyanidine. Pour s'en assurer, un peu de cyanidine fut extraite de *Centaurea cyanus L.* afin de comparer les réactions colorimétriques des deux corps : elles se révélèrent absolument identiques.

Enfin, pour confirmer l'identité du pigment anthocyanique des germes de Pomme de terre (var. Bintje) avec la cyanidine, le spectre d'absorption du pigment purifié fut établi grâce au Spectrophotomètre de Beckmann ; nous le reproduisons ici (fig. 20) et l'on peut constater qu'il est absolument identique à celui donné par d'autres auteurs, tels SCHOU (Cité par T. A. GEISSMAN, dans « Moderne Methoden der Pflanzenanalyse », de K. PAECH et M. V. TRACEY, vol. III.)

2° Dosage de la cyanidine dans les germes de Pommes de terre saines et malades

Cette expérience fut réalisée sur des germes ayant poussé à l'obscurité totale, puis exposés à la lumière, comme cela a été décrit pour le dosage de l'acide chlorogénique.

A partir du moment où les germes étaient sortis de l'obscurité, un prélèvement était fait toutes les 12 ou 24 heures, dans le but :

— de doser l'anthocyane,

— d'évaluer la quantité de virus.

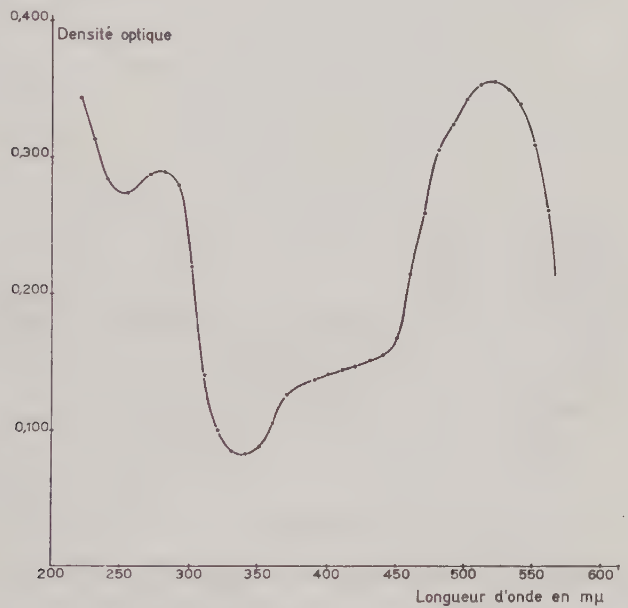


FIG. 20. — Spectre d'absorption de la Cyanidine extraite de germes de Pomme de terre (var. Bintje).

La quantité d'anthocyane était évaluée suivant la technique de K. V. THIMANN (1949) (14). Elle consiste tout simplement à broyer les organes dans de l'acide chlorhydrique normal et à centrifuger afin de clarifier la solution. Les valeurs données par cette simple extraction ont été comparées à celles obtenues après une séparation plus poussée par l'alcool isoamylique : ces valeurs sont absolument comparables et on ne gagne rien à purifier la solution anthocyanique, comme l'avait déjà signalé THIMANN en 1949 (14). L'estimation de la quantité d'anthocyane se fait par lecture au photocolorimètre de Coleman à 550 m µ et est exprimée en unités de pigments par gramme de poids frais de germes ; cette expression des résultats est d'ailleurs analogue à celle adoptée par THIMANN, puisque celui-ci exprime la quantité d'anthocyane en unités par

10 ml de solvant utilisé pour l'extraction d'un poids connu de matériel végétal.

Quant à la quantité de virus, elle fut évaluée sérologiquement par la limite de dilution, technique déjà décrite précédemment.

Les résultats d'une des expériences sont résumés dans le Tableau nº XIV et traduits sous forme de schéma (fig. 21).

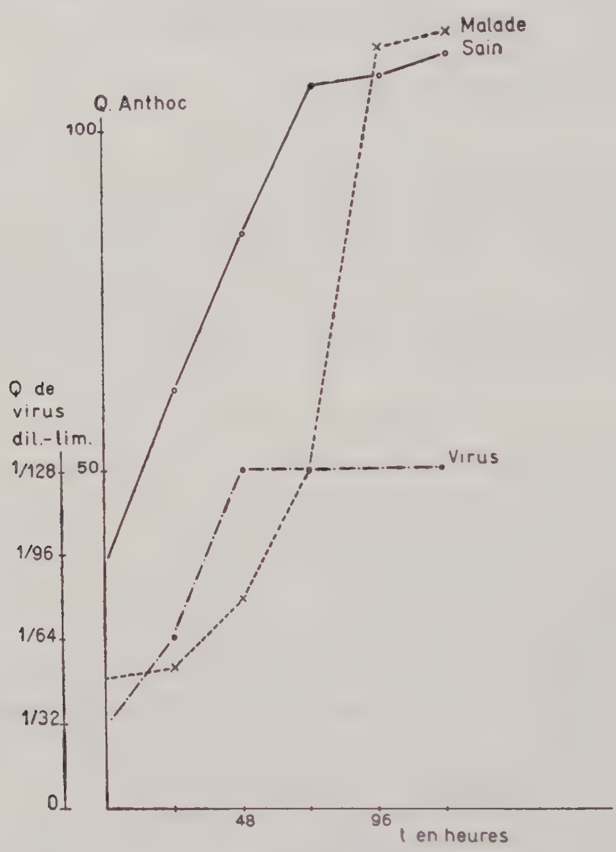


Fig. 21. — Évolution de la quantité d'anthocyane et de virus en fonction du temps dans les germes de Pomme de terre saine et malade (virus Y).

On s'aperçoit que si, chez les plantes saines, la quantité d'anthocyane croît régulièrement à partir du moment où les germes sont exposés à la lumière et passe de 35 au temps 0 à 111 après 120 heures d'éclairement, chez les plantes malades, il y a d'abord un « plateau », pendant les premières 48 heures dans le cas présent, durant lesquelles la quantité de pigment ne s'accroît que faiblement, puisqu'elle passe de 19 à 31 ; puis brusquement, une synthèse abondante a lieu, à une vitesse comparable à celle enregistrée chez les plantes saines ; à la fin de cette dernière période, la quantité de pigment est comparable chez les plantes saines et chez les

plantes malades (111 chez les plantes saines et 114 chez les plantes malades).

Si nous examinons maintenant l'évolution de la quantité de virus dans les exemplaires malades pendant le même temps, nous nous apercevons que la quantité de virus qui était relativement faible au départ (dilution-limite 1/32) croît pendant les premières 48 h. pour arriver à un maximum (dilution-limite 1/128), maximum autour duquel les variations sont très faibles. Cette influence de la lumière sur la synthèse du virus

TABLEAU XIV

Evolution de la quantité d'anthocyane en fonction du temps chez la Pomme de terre saine et malade (germes)

Temps en heures	Quantité d'anthocyane en unités par g. de poids frais		Q. de virus dilution-limite
	saines	malades	
0	35	19	1/32
24	64	22	1/64
48	86	31	1/128
72	106	50	1/128
96	108	112	1/128
120	111	114	1/128

Les poids secs correspondants à cet essai sont ceux donnés dans le Tableau XII ; les manipulations concernant le dosage des phénols et celui des anthocyanes ayant été faites sur le même matériel.

n'est pas un phénomène nouveau, mais dans les conditions où nous l'avons étudiée, elle nous a permis de montrer son effet inhibiteur sur la formation de l'anthocyane.

DISCUSSION

Les résultats des dosages que nous avons effectués montrent de manière très claire que la synthèse du pigment anthocyanique est inhibée pendant que le virus se développe. (MARTIN, 1958) (50).

Ces essais laissent donc supposer qu'il existe un point commun entre la synthèse des nucléoprotéines (ou de leurs constituants, bases puriques et pyrimidiques) et la synthèse des pigments anthocyaniques. En effet, d'une part une brusque synthèse de virus inhibe la production d'anthocyanes et, d'autre part, lorsque la synthèse de la nucléoprotéine est terminée, celle des pigments reprend.

Cette hypothèse est d'ailleurs en accord avec les conclusions que formulent K. V. THIMANN et coll. (1949) (14) -1951 (15) -1955 (16)-1955 (17), à la suite d'une série de travaux sur la synthèse des anthocyanes chez une lentille d'eau : *Spirodela oligorrhiza* Kurtz. En effet ces auteurs ont mis en évidence que :

1° La synthèse des anthocyanes chez cette plante est inhibée par

des corps comme le thiouracil, la 2-6 diaminopurine, la 8-azaguanine, etc... qui sont des antipurines ou antipyrimidines.

2° Cette inhibition est détruite par des corps comme l'uracil, la purine et la guanine.

Thimann et coll. concluent de ces essais que la synthèse des anthocyanes fait appel à une base purique ou pyrimidique, à un stade encore non déterminé de cette synthèse.

On sait, d'autre part, quela synthèse du virus est inhibée par les corps déjà cités : thiouracil, 2-6 diaminopurine, 8-azaguanine et que cetteinhibition est détruite par leurs homologues naturels : uracil, adenine, guanine.

Ces deux synthèses, celle des nucléoprotéines-virus d'une part, et celle des anthocyanes d'autre part, présentent donc les particularitéssuivantes :

1° Elles ont des inhibiteurs communs.

2° S'il y a dans la cellule prédominance d'une des deux synthèses (cas des maladies à virus), l'autre est inhibée.

Des travaux concernant la biosynthèse du noyau flavonique ont d'ailleurs été récemment entrepris.

Diverses hypothèses ont été émises depuis Robinson (1936) (12) parmi lesquelles il faut citer celles de : Birch et Donovan (4), de Davis (5), de Geissmann (7) etc.

Mais c'est en utilisant des précurseurs marqués que Underhill, Watkin et Neish (1957) (18) d'une part, et Geissmann et Swain (1957) (7) d'autre part, ont résolu le problème concernant la quercetine chez le Fagopyrum. Ces auteurs ont montré que le noyau B, c'est-à-dire, l'unité C_6C_3 peut avoir pour précurseurs : l'acide shikimique, la phenyl-alanine, l'acide p. hydroxycinnamique et l'acide cinnamique (très bons précurseurs) et, par ordre d'activité décroissante ; l'acide caféique, l'acide sinapique et l'acide férulique.

Les auteurs dégradent ensuite la quercetine obtenue par fusion alcaline après l'avoir méthylée, ce qui leur donne :

O OH
HO C — OH
C
OH C OH
O

H_3CO — OH
— CO — CH_2OCH_3
OCH_3
+ HOOC OCH_3 OCH_3

2′ hydroxy – 2 – 4′ – 6′ trimethoxy–acétophénone   Ac. vératrique

Ils retrouvent de cette façon 2/9 de l'activité de la quercetine à partir de la phenylalanine uniformément marquée dans les dérivés acéto-

phénone et 7/9 dans l'acide vératrique. Aucun des composés cités n'était un bon précurseur du noyau A.

Poursuivant leurs recherches, ils montrent que si l'on fournit aux plantes du saccharose uniformément marqué ou du $^{14}CO^2$ (assimilé par photosynthèse) la quercetine formée est uniformément marquée dans les noyaux A et B ; d'autre part, seuls l'acétate 1 ^{14}C ou 2-^{14}C sont des précurseurs du noyau A et la quercetine obtenue en fournissant aux plantes cet acétate est uniquement et parfois entièrement marquée dans lenoyau A.

La synthèse des composés benzéniques chez les plantes fait donc appel au moins à deux voies différentes : la première passe par l'acide shikimique et fournit les dérivés phénylpropane (ceci avait déjà été trouvé par DAVIS, travaillant avec des bactéries) ; la seconde se fait par condensation d'unités acétate comme l'avait suggéré BIRCH et DONOVAN.

Voici comment on peut schématiser l'ensemble de ces faits :

Sucres

Pyruvate — Ac. Shikimique

Acétate → Acetyl-Coenz. A — Ac. Phenylpyruvique ⇄ Phénylalanine / Ac. Cinnamique

3 mol.

CH$_2$ — HO — C — COOH CH — B — A — H — HC — C — C — C — OH — OH — O

Intermédiaire supposé I forme énol.

— H_2O

HO — OH — A — CH — B — C — C — OH — OH — O

Intermédiaire supposé II.

Oxydation (— 2H) + hydroxylation.

O — OH — HO — A — B — OH — C — OH — OH — O

Quercétine.

En 1957 également, GRISEBACH (8) étudiant la biosynthèse d'une anthocyanidine, la cyanidine, chez le Chou-Rouge, apporte des résultats absolument semblables à ceux de NEISH et de GEISSMAN confirmant en particulier la synthèse du noyau A, par condensation de restes acétates ; il montre de plus qu'avec l'acétate $1\text{-}^{14}C$, 98 p. 100 de la radioactivité est contenue dans les carbones du phloroglucinol qui portent les groupements hydroxyles (le phloroglucinol provenant de la dégradation de la cyanidine et représentant le noyau A) ; avec l'acétate $2\text{-}^{14}C$, ces trois atomes de carbone ne contiennent que 17 p. 100 de la radioactivité, tandis que les trois autres en renferment 83 p. 100.

Nous avons volontairement détaillé ce paragraphe concernant la biosynthèse des composés flavoniques afin d'exposer plus clairement la suite de la discussion.

Nos travaux concernant les déviations de métabolisme des phénols et des anthocyanes chez le Tabac et la Pomme de terre malades étaient déjà très avancés (cf référence n° 9) lorsque GEISSMAN (1956) publiait les résultats de ses recherches concernant l'accumulation de composés flavoniques chez le Pêcher et le Cerisier atteints de maladies à virus ; l'accumulation d'acide chlorogénique en particulier est relativement importante, observation analogue aux nôtres concernant le Tabac et la Pomme de terre ; d'autre part les feuilles de Cerisiers malades renferment près de deux fois plus d'acide caféique (un des constituant de l'acide chlorogénique) que les feuilles saines et environ trois fois plus de kampferol et de quercetine.

Kampferol

Quercetine

Ces corps sont comme on le voit ici, étroitement apparentés aux anthocyanes. Personnellement nous avons toujours trouvé avec le germe de Pomme de terre, des quantités supérieures de cyanidine chez les plantes malades lorsque la *synthèse du virus était terminée* ; mais les différences entre plantes saines et plantes malades étaient trop faibles pour que nous puissions affirmer qu'elles étaient réelles et générales. Il convient cependant, de noter que le graphique n° 21 montre que la fin de la synthèse rapide du virus étant atteinte, celle des anthocyanes reprend chez les plantes malades à une vitesse nettement supérieure à celle des plantes saines ; en effet, si l'augmentation maximum du taux de cyanidine est de 29 unités en 24 h., chez les plantes saines (du temps 0

au temps 24 h.) elle est de 62 unités en 24 h., chez les plantes malades après la synthèse du virus (du temps 72 h., à 96 h.).

GEISSMAN n'a pas étudié l'évolution des composés flavoniques en fonction du temps depuis le moment de l'inoculation (le matériel avec lequel il travaillait, Cerisier et Pêcher ne se prêtait d'ailleurs pas facilement à ce genre de travail). Ses études ont consisté à comparer des plantes saines à des plantes malades chez lesquelles la maladie était déjà bien installée.

Nous avons eu personnellement la chance d'étudier ce problème sur la Pomme de terre et nous avons pu mettre en évidence cette inhibition temporaire de la synthèse des anthocyanes. Mais ce travail est incomplet. Le fait que les tissus jeunes, encore en croissance, donc présentant un métabolisme intense, renferment une plus grande teneur en composés phénoliques que les tissus adultes, ne fait plus de doute ; nous en avons nous-même fait l'observation au cours de nos essais chez le Tabac. Mais récemment en 1958, ZUCKER et AHRENS (19) ont étudié ce problème en détail ; ils montrent que les quantités d'acide chlorogénique présentes dans les jeunes feuilles du sommet peuvent atteindre le double des quantités rencontrées dans les feuilles adultes. Il nous faut maintenant savoir si les premières phases de la multiplication du virus affectent d'une manière analogue la teneur en acide cafféique, unité en C_6C_3 (composant l'acide chlorogénique) et la teneur en unités $C_6C_3C_6$. Nous avons entrepris cette étude et pensons en publier les résultats prochainement.

Quoiqu'il en soit cette compétition entre synthèse des composés flavoniques et synthèse de la nucléoproteine virus présente un grand intérêt. On sait en effet, depuis les travaux de BRODA et ses collaborateurs en 1955, que le virus récemment inoculé donc en voie de multiplication rapide, emprunte 115 fois plus de carbone assimilé par photosynthèse, pour bâtir ses acides nucléiques, que pour synthétiser sa partie protéique ; cette dernière semble donc dépendre au moins en début d'infection, des acides animés et plus généralement des métabolites préexistant dans la cellule au moment de l'inoculation, tandis que la partie nucléique serait synthétisée *de novo* par la cellule.

Il reste à savoir comment cette synthèse anormale d'acides nucléiques inhibe la production par la cellule de corps comme la cyanidine et les anthocyanes en général. Plusieurs hypothèses peuvent être émises ;

1º Les acides nucléiques du virus détournent à leur profit la plus grande partie des métabolites nécessaires aux deux synthèses ; on pourrait supposer, par exemple, qu'ils utilisent tout l'acétate nécessaire à la synthèse du noyau A des flavones (voir schéma plus haut). On devrait alors avoir dans ce cas, accumulation des précurseurs du noyau B, à

moins que le prélèvement de métabolites normaux ne soit plus général et se fasse au niveau des sucres nouvellement synthétisés.

2° Le virus empêche les enzymes et cœnzymes invoqués dans la synthèse des composés en C_6-C_3-C_6, d'intervenir dans cette voie :

— soit qu'il s'agisse d'une inhibition momentanée pure et simple ;

— soit que le virus utilise les enzymes et cœnzymes à la synthèse de ses acides nucléiques.

Il est d'ailleurs possible et même probable que ce n'est pas l'un ou l'autre des mécanismes qu'il faut retenir, mais les deux en même temps, ce qui n'est pas pour faciliter les recherches dans ce domaine.

IX. — UTILISATION DE L'ANOMALIE DE PIGMENTATION POUR UN DIAGNOSTIC PRATIQUE DES MALADIES A VIRUS CHEZ LA POMME DE TERRE

Après avoir découvert des irrégularités de pigmentation des germes de Pomme de terre, nous avons cherché à utiliser ce caractère pour le diagnostic des plantes malades.

On sait, en effet, que la Pomme de terre est atteinte par trois virus du type Mosaïque, les virus X, Y, et A. Or, si pour les deux premiers, on possède des anti-sérums spécifiques, il n'en est pas de même pour le virus A ; pour ce dernier, tous les essais visant à obtenir un anti-sérum utilisable pratiquement ont échoué. D'autre part, il serait, dans la pratique, intéressant d'avoir une méthode de diagnostic rapide permettant de tester un matériel important, ce que ne permet pas la méthode sérologique ; en effet, si cette dernière est précise et sûre, elle est relativement longue lorsqu'elle est utilisée comme méthode de diagnostic. C'est la raison pour laquelle nous avons tenté d'appliquer le test à l'indophénol au diagnostic des maladies à virus de la Pomme de terre.

Cette mise au point du test sur germes de Pomme de terre nous a conduit à étudier les conditions d'humidité, de température et de lumière favorables à sa réalisation. En effet, nous avons indiqué que lorsque les germes poussent uniquement à la lumière, les extraits de plantes malades recolorent le leuco-dérivé d'indophénol plus vite et plus intensément que les extraits de plantes saines ; mais, dans certains cas, ces dernières donnent une recoloration qui n'est parfois pas négligeable ; si, par contre, les germes ont poussé uniquement à l'obscurité, les extraits de germes sains ne recolorent jamais l'indophénol, mais les extraits de plantes malades le recolorent beaucoup trop lentement. Il fallait donc déterminer les conditions dans lesquelles cette réaction était la plus nette.

Cette étude nous a permis de préciser les conditions suivantes pour

la bonne réalisation du test ; les tubercules étant au repos au moment où l'on effectue ce test, il faut d'abord rompre la dormance. Pour cela :

a) on les soumet à l'action d'un activateur de germination, mélange :

monochlorhydrine de glycol	7
dichloréthylène..	3
tétrachlorure de carbone	1

b) ils sont ensuite placés à l'obscurité complète, à une température comprise entre 18 et 22°C, dans une atmosphère à 90 p. 100 d'humidité ;

c) lorsque les germes ont de 3 à 4 cm de longueur, ils sont alors soumis à une lumière diffuse pendant 3 à 4 jours.

On obtient dans ces conditions, un diagnostic colorimétrique parfaitement sûr. (MARTIN et QUEMENER, 1956) (9).

C'est également dans ces conditions qu'apparaissent sur les germes les symptômes très caractéristiques que nous avons décrits.

Néanmoins, le test à l'indophénol reste délicat dans son application pratique, du fait qu'il fait appel à une réaction enzymatique.

Par contre, l'anomalie de pigmentation est facilement utilisable comme moyen de diagnostic, les symptômes sur germes permettant de séparer avec une très grande précision les plantes atteintes de virus X, Y et A (fig. 22).

19 variétés, en dehors de la Bintje, ont déjà été étudiées dans le but de détecter, par cette méthode, les virus X et Y. Nous avons pu, de cette façon, montrer que la précision donnée par ce diagnostic est de l'ordre de 99 p. 100. Les quelques erreurs que l'on peut faire lors de l'examen après la première germination peuvent être corrigées par l'examen des germes après une deuxième germination ; on obtient d'ailleurs, dans ces conditions, des symptômes encore beaucoup plus nets qu'après la première germination.

RÉSUMÉ ET CONCLUSION

Les observations faites au cours de l'extraction du virus de la Mosaïque du Dahlia et au cours du diagnostic sérologique des virus de la Pomme de terre ont attiré notre attention sur l'importance des phénomènes d'oxydation lorsqu'on veut détecter ou isoler un virus.

Une première série d'expériences a permis de mettre en évidence l'importance de ces phénomènes d'oxydation dans la dénaturation de certains virus au cours de leur extraction. Nous avons pu montrer, de cette façon, que le virus Y de la Pomme de terre est complètement précipité de ses solutions après 15 minutes d'action du système Polyphénol-oxydase-catéchol.

Partant de ces faits, nous avons mis au point une technique qui, évitant ces oxydations, donne un diagnostic sérologique plus sûr et permet d'obtenir de meilleurs rendements au cours de l'extraction des virus.

Une étude plus détaillée a permis ensuite de montrer que ces phénomènes d'oxydation sont beaucoup plus importants chez les plantes malades que chez les plantes saines et se traduisent par un brunissement plus rapide et plus intense des jus de plantes malades. En utilisant la recoloration du leuco-dérivé du 2-6 dichlorophénol-indophénol, nous avons imaginé un nouveau test, permettant de séparer les plantes saines des plantes malades ; en effet, dans certaines conditions bien précises, les jus de plantes malades sont capables de réoxyder, donc de recolorer, ce leuco dérivé, alors que les jus de plantes saines en sont incapables.

Nous avons alors étudié d'une façon plus approfondie l'activité de certaines oxydases chez les plantes malades : cette étude nous a permis de montrer que les activités de la cytochrome-oxydase, de la peroxydase et de la polyphénol-oxydase sont plus élevées chez les plantes atteintes de maladies à virus. Ces résultats confirment ceux obtenus par différents auteurs sur le Tabac inoculé avec le virus de la Mosaïque du Tabac. Nous avons personnellement étendu ces résultats à d'autres virus (X et Y de la Pomme de terre sur Tabac) et à d'autres plantes : Tomate et Pomme de terre hébergeant leurs virus respectifs. L'étude plus détaillée sur la polyphénol-oxydase a permis de confirmer l'existence d'un premier maximum d'activité de 24 à 72 h après l'inoculation, puis d'un deuxième maximum au moment de l'éclosion des symptômes. Cette étude, réalisée avec l'appareil de Warburg, nous a permis de mettre en évidence une absorption anormalement élevée d'oxygène en l'absence de substrat, dans les fioles renfermant des jus de plantes malades.

Cette observation nous a amené à émettre l'hypothèse qu'il existait chez les plantes malades des substrats de cet enzyme, que l'on ne rencontrait pas chez les plantes saines, le brunissement intense du jus laissant supposer qu'il s'agissait de composés phénoliques. La chromatographie sur papier tamponné nous a permis de mettre en évidence l'accumulation de différents composés phénoliques chez les plantes malades. Après avoir isolé et purifié de petites quantités de ces corps, nous avons pu les identifier comme étant les acides chlorogénique et isochlorogénique chez le Tabac et la Pomme de terre. Un autre phénol, renfermant de l'acide caféique, a également été isolé, mais étant donné les faibles quantités de ce corps chez les plantes étudiées, nous n'avons pas pu pousser plus loin nos investigations à son sujet. Nous avons également montré, par chromatographie, l'accumulation d'acide chlorogénique chez le Dahlia atteint du virus de la Mosaïque du Dahlia et du virus de la Mosaïque du Concombre. Nous avons enfin, au cours de cette étude, isolé et caractérisé un autre phénol, la rutine, chez la Pomme de terre et le Tabac, lorsque ces plantes sont âgées et près de leur époque de floraison.

En nous basant sur le pouvoir réducteur des phénols et en utilisant





Fig. 22 - Symptômes sur germes de pomme de terre
à gauche : germes sains - à droite : germes malades (virus Y)

la microméthode de PARK et JOHNSON (10) de dosage des sucres réducteurs nous avons pu doser l'acide chlorogénique chez le Tabac et chez la Pomme de terre. Ces dosages montrent que la quantité d'acide chlorogénique chez les plantes malades peut atteindre le double de celle des plantes saines.

Cette étude nous a également permis de montrer que l'accumulation de phénols a lieu lorsque les symptômes sont nettement apparents, c'est-à-dire quand la synthèse du virus est pratiquement terminée.

Lorsque les plantes vieillissent et approchent de leur floraison, les différences s'estompent.

Ces observations permettent de suggérer qu'au moment où la plante fait la synthèse de la protéine-virus, il apparaît dans ses tissus des composés phénoliques analogues à ceux qui se forment lorsque le stimulus floral est déclenché, c'est-à-dire lorsque la plante synthétise une grande quantité de nucléoprotéines normales.

L'examen en lumière ultra-violette des nombreux chromatogrammes que nous avons été amené à faire au cours de l'étude des phénols nous a permis de mettre en évidence l'accumulation de composés fluorescents chez les plantes virosées (Tabac et Pomme de terre). Une étude détaillée du plus important de ces corps a montré qu'il ne s'agissait pas de scopolétine libre comme le pense BEST mais d'un glucoside de cette coumarine substituée, la scopoline, chez lequel le sucre rattaché à l'aglucone est le glucose.

Des mesures réalisées sur le coléoptile d'Avoine ont montré que ce corps était inhibiteur de croissance et les résultats de cet essai permettent de confirmer, d'une façon indirecte, les résultats d'ANDREAE (1952) (1) et de RABIN et KLEIN (1957) (11) concernant l'inhibition compétitive de l'oxydation de l'indol-acétique par des corps comme la scopolétine et l'acide chlorogénique.

Étant donné ces faits, il est possible que l'accumulation de scopoline et de corps analogues joue un rôle dans le nanisme des plantes virosées.

Enfin, en voulant faire de la recoloration du leuco-dérivé du bleu d'indophénol un test permettant le diagnostic des maladies à virus chez la Pomme de terre, nous avons découvert que, dans des conditions bien précises, il existe des anomalies de pigmentation chez les germes issus de tubercules porteurs de virus. On connaissait déjà, depuis longtemps, l'influence des virus sur la pigmentation des fleurs, mais personne n'avait signalé cette action sur des organes aussi différents des fleurs que le sont les germes de Pomme de terre. Étant donné la généralité du phénomène et les possibilités qu'offrait le matériel Pomme de terre, il nous a semblé intéressant d'étudier, en fonction du temps et de la synthèse du virus, la production de pigments anthocyaniques (la

cyanidine dans le matériel utilisé) chez les plantes saines et chez les plantes malades.

Cette étude nous a montré que la formation de l'anthocyane, dans le germe de Pomme de terre, est inhibée tant qu'il y a synthèse abondante de virus. Lorsque cette dernière est terminée. la synthèse du pigment reprend et il n'est plus possible alors de mettre en évidence une différence nette entre plante saine et plante malade.

Or, des travaux récents de Thimann (17) et de ses collaborateurs ont montré que, chez *Spirodela oligorrhiza*, la synthèse de cyanidine est inhibée par des corps comme la thiouracil, la 2-6 diaminopurine l'azaguanine, etc... D'autre part, cette inhibition est détruite par les homologues naturels de ces composés. Thimann à la suite de ces essais, conclut que la synthèse des pigments anthocyaniques met en jeu une base purique ou plus vraisemblablement pyrimidique, à un stade encore non déterminé de cette synthèse. Enfin, d'après Thimann, la synthèse des anthocyanes fait appel à un enzyme à Cu, qui est, sinon la polyphénol-oxydase, du moins un enzyme très voisin et des composés phénoliques interviennent vraisemblablement dans cette synthèse.

Or, on sait que la multiplication des virus est inhibée par les corps déjà cités et étudiés par Thimann : thiouracil, 2-6 diaminopurine, 8-azaguanine et que cette inhibition est également détruite par les homologues naturels.

On peut donc imaginer que le virus, au cours de sa multiplication, interfère avec la synthèse des anthocyanes en détournant à son profit les bases puriques et pyrimidiques qui, normalement, interviennent dans la synthèse de ces pigments ; puis, lorsque le taux de virus atteint son maximum, ces bases sont de nouveau utilisables dans la chaine de réactions qui mène aux anthocyanes.

Le fait que les deux phénomènes, synthèse de nucléoprotéines virus et d'anthocyanes, ont un point commun, semble confirmé par l'activité accrue de la polyphénol-oxydase et par l'accumulation des composés phénoliques qui intervient dans les deux cas.

Enfin, un simple examen de la structure des différents corps que nous avons étudiés : phénols, corps fluorescents (scopoline) et anthocyane (cyanidine) montre leur grande analogie :

Ac. Quinique
OH
O O
HO — C
CH
C
H
Acide chlorogénique

O
Glucose - - O C = O
H_3CO CH
C
H
Scopoline

Cl
OH
O
HO — — OH
OH
OH
Cyanidine

On retrouve, dans tous ces corps, le noyau de l'acide cinnamique, cyclisé ou non, et diversement substitué.

— CH = CH — COOH

Nos connaissances sur le mécanisme biologique de la synthèse de ce noyau d'une part, et des bases puriques et pyrimidiques d'autre part, ne sont malheureusement pas suffisamment avancées pour que nous puissions comprendre la façon dont interfèrent l'une sur l'autre ces différentes réactions.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) ANDREAE (W. A.). — Effect of scopoletin on indolacetic metabolism. *Nature*, **170**, 58, 1952.
(2) BAWDEN (F. C.). — Plant viruses and virus diseases. 327 p. Chronica Botanica Company, 1950.
(3) BEST (R. J.). — Virus. Host Interaction. *Aust. J. of Research*, **16**, 5-9,1953.
(4) BIRCH (A. J.) et DONOVAN (F. W.). — (*Australian*). *J. Chem.*, **6**, 360-373. 1953.
(5) DAVIS (B. D.). — Intermediates in amino-acid biosynthesis. *Advances in Enzymol.*, **16**, 247-312, 1955.
(6) GEISSMAN (T. A.). — The flavonoids constituents of normal and virus infected Peach and cherry leaves-*Arch. Biochem. Bioph.*, **60**, 21-26, 1956.
(7) GEISSMAN (T. A.) et SWAIN (T.) — Biosynthesis of flavonoid compounds in higher plants. *Chem. and Indust.*, **28**, 984, 1957.
(8) GRISEBACH (H.) — Studies on the biosynthese of cyanidin with the aid of carbone 14 labelled compounds. Intern. Confer. on Radio-Isotopes in Scientific Research. T-à-p. Unesco/NS/RJC/186, 1957.
(9) MARTIN (C.) et QUEMENER (J.). — Sur un test colorimétrique et quelques symptômes permettant la détection des maladies à virus chez la Pomme de terre. *C. R. Acad. Agric.*, **42**, 426-431, 1956.
(10) PARK (J. T.) et JOHNSON (M. T.). — Sub microdetermination of glucose. *J. Biol. Chem.*, **181**, 149-151, 1949.
(11) RABIN (R. S.) et KLEIN (R. M.). — Chlorogenic Acid as a competitive inhibitor of indolacetic acid oxidase. *Arch. of Biochem. and Biophys*, **70**, 11-15, 1957.
(12) ROBINSON (R.). — Formation of Anthocyanins in Plants, *Nature*, **137**, 172-173, 1936.
(13) ROBINSON (G. M.) et ROBINSON (R.). — A survey of anthocyanins. *Biochem. J.*, **25**, 1687-1 705, 1931.
(14) THIMANN (K. V.) et EDMONDSON (Y. H.). The biogenesis of anthocyanins. I. General nutritional conditions leading to anthocyanin formation. *Arch. of Biochem.*, **22**, 33-53, 1949.
(15) THIMANN (K. V.), EDMONDSON (Y. H.) et RADNER (B. S.). — The biogenesis of anthocyanins. III. The role of sugars in anthocyanin formation. *Arch. of Biochem. and Biophys*, **34**, 305-323, 1951.
(16) THIMANN (K. V.) et RADNER (B. S.). — The biogenesis of anthocyanins. IV. The inhibitory effect of methionine and other sulfur containing compounds. *Arch. of Biochem. and Biophys.* **58**, 424-497, 1955.

(17) Thimann (K. V.) et Radner (B. S.). — The biogenesis of anthocyanins V. Evidence for the mediation of pyrimidines in anthocyanin synthesis. *Arch. of Biochem. and Biophys.* **59**, 511-525, 1955.
(18) Underhill (E. W.), Watkin (J. E.) et Neish (A. C.). — Biosynthesis of quercetin in Buckweat. *Canad. J. Biochem. Physiol*, **35**, 219-237, 1957.
(19) Zucker (M.) et Ahrens (J. F.). — Quantitative assay of Chlorogenic Acid and its pattern of distribution within Tobacco leaves. *Plant Physiol*,. **33**, 246-249, 1958.

ÉTUDE DES VARIATIONS DES SUBSTANCES AZOTÉES AU COURS DE LA VÉGÉTATION DE L'ORGE

(2e MÉMOIRE) (1)

ÉTUDE DE LA FORMATION DE L'ÉPI ET DE LA MATURATION DU GRAIN.

PAR

J. M. LEFEBVRE

Station centrale de Physiologie végétale, Versailles.

PLAN DU MÉMOIRE

HISTORIQUE

Peu de recherches ont été faites sur la protéogenèse dans les graines en voie de formation depuis les travaux de E. SCHULZE (2) et d'EMMERLING (2). Ces chercheurs ont découvert les faits essentiels : la migration des substances azotées solubles des feuilles et des tiges vers les fruits. Chez *Vicia faba* et *Pisum sativum*, une partie des substances azotées s'accumule dans les gousses, avant d'être utilisée à la synthèse protéique dans les graines.

MASKELL et coll. (1929, 1930) ont mis en évidence des faits analogues.

(1) Extraits d'une thèse de Doctorat de l'Université de Paris.
(2) E. SCHULZE (1878) et EMMERLING (1880), cités par CHIBNALL (1939).

Les formes azotées solubles émigrent des feuilles et des tiges de Cotonnier pendant la période de formation dufruit.

De même, WHITEHEAD et coll. (1948, 1949, 1950) ont montré que l'enrichissement en substances azotées des grains de Maïs correspond à une diminution de la teneur en azote dans les limbes, les gaines foliaires et les hampes. L'incorporation des amides dans les cotylédons est lente mais complète chez *Pisum sativum* (RAACKE, 1957 *a*, *b*).

De plus, CHIBNALL (1939) a souligné à propos des Graminées, dont les graines sont très riches en glucides, que la migration protéique est accompagnée d'une migration glucidique encore plus intense.

DUCET (1949) a étudié la teneur des graines d'Orge et de Soja en choline totale et en choline hydrosoluble. Les variations des différentes formes de choline pendant la formation de l'épi et des gousses montrent que la choline est synthétisée sur place et ne provient pas de sa mobilisation dans les chaumes ou les tiges.

L'expérience précédemment décrite a permis d'observer les variations du métabolisme azoté des feuilles lors de la formation de l'épi. Dans les expériences relatées ci-dessous, seul l'épi a été étudié.

MÉTHODES ET TECHNIQUES

Le mode de prélèvement est le suivant :

Les épis, au nombre de cent environ, sont récoltés seulement sur les trois talles principales de chaque plante afin depermettre une bonne homogénéité des lots. Les épis formés sur les autres talles se développent plus tardivement, mais aussi plus rapidement. En raison de ces différences, je ne les ai pas retenus.

Les épis sont coupés à quelques millimètres en dessous de l'épillet basal, 10 épis sont prélevés au hasard dans chaque série et fixés, après que les barbes aient été coupées à l'extrémité des glumelles.

Les échantillons analysés comprennent donc : les grains avec leurs enveloppes, glumes et glumelles, ainsi que le rachis.

Les prélèvements effectués d'abord toutes les semaines dans la première expérience ne permettant pas l'observation de variations rapides, une seconde expérience a été réalisée en 1955, les prélèvements étant faits tous les deux ou trois jours, soit sur des plantes cultivées comme les précédentes, soit sur des plantes qui recevaient un apport azoté minéral lors de l'épiaison.

Les techniques analytiques utilisées pour les formes azotées sont celles décrites dans le premier mémoire [1].

[1] Annales de l'I. N. R. A., Physiologie Végétale n° 1, 1959.

Analyse chromatographique des acides aminés.

Déminéralisation des extraits.

Il est indispensable de déminéraliser les extraits végétaux avant la chromatographie sur papier (CONSDEN et coll., 1948).

On pratique cette opération en fixant les acides aminés et les cations minéraux sur une résine échangeur de cations telle que Dowex 50 ou Permutite C 50 préalablement activée à l'HClN. Les acides aminés sont ensuite quantitativement déplacés par NH_4OHN, les cations minéraux restant fixés sur la résine.

Vingt-cinq cm^3 de l'extrait hydroalcoolique sont mis dans un bécher avec 0,5 cm^3 d'acide acétique glacial, laissés une nuit à la glacière et filtrés s'il y a lieu. Ce traitement permet d'une part d'éliminer des protéines éventuellement solubilisées et, d'autre part, d'acidifier le liquide avant le passage sur la résine. Vingt cm^3 sont recueillis dans une fiole jaugée. Ce liquide est versé sur une colonne de 12 mm de diamètre intérieur, faite de 8 à 10 g de résine préalablement activée suivant la technique décrite par BOULANGER et coll. (1951), et dont on a déterminé la capacité d'échange à l'aide d'ammoniaque N (PETIT et coll. 1952).

On fait couler le liquide à raison de 5 gouttes/minute pour obtenir une bonne fixation. La colonne est lavée avec 500 cm^3 d'eau bidistillée. Les glucides, non retenus, sont également éliminés par ce lavage.

On effectue ensuite le déplacement des acides aminés en versant sur la colonne 500 cm^3 d'NH_4OHN. Le liquide ammoniacal recueilli dans un ballon est concentré sous vide jusqu'à siccité. Le dépôt est dissous dans quelques cm^3 d'eau bidistillée afin de pouvoir le transférer dans une petite capsule. L'eau est ensuite évaporée sous vide en présence de P_2O_5.

L'extrait sec redissous par l'eau, la solution est amenée à 0,5 ou 1 cm^3 dans un petit tube gradué selon les quantités d'N aminé, et conservé dans une glacière. Ce liquide est utilisé pour la séparation des amino-acides par chromatographie sur papier.

Chromatographie des acides aminés sur papier et dosage.

La séparation chromatographique est effectuée sur papier Whatman n° 1 (lavé avec une solution aqueuse d'acide oxalique à 1 p. 100 et à l'eau), à 24°C, avec une prise d'essai variant de 5 à 50 μl suivant la teneur en azote aminé total.

Les solvants sont : phénol saturé d'eau + cupron (200 mg par litre), en atmosphère de CO_2 pour la première dimension ; butanol-acide acétique-eau : 40-10-50 (PARTRIDGE, 1948), pour la deuxième dimension.

Il est important d'éliminer totalement le phénol du papier avant le passage du deuxième solvant.

La révélation des taches d'amino-acides est effectuée suivant la technique de THOMPSON et coll. (1951 *a*, *b*). Les chromatogrammes bien séchés sont imprégnés par pulvérisation de 50 cm³, pour une feuille de 48 × 56 cm, d'une solution de ninhydrine à 0,5 p. 100 dans le butanol saturé d'eau. La feuille séchée d'abord dans un courant d'air est introduite dans une étuve étanche contenant de l'alcool éthylique, dans laquelle on chasse l'air par un courant de CO_2 afin d'éviter les oxydations parasites. La révélation a lieu à 52°C pendant 35 minutes.

Les taches obtenues sont découpées, pesées et déposées dans un tube à essai avec 5 cm³ d'alcool à 50° G. L. On agite vigoureusement pour bien extraire le dérivé coloré.

Des rondelles de papier traitées de la même façon permettent d'obtenir les témoins nécessaires aux dosages colorimétriques.

Au bout d'une heure d'extraction, le dosage colorimétrique est effectué au spectrophotomètre Coleman à 570 mμ pour les colorations obtenues avec la plupart des acides aminés, et à 450 mμ pour les colorations jaunes obtenues avec la proline, l'hydroxyproline et l'asparagine. La nature des amino-acides est connue d'après leur Rf. et d'après les colorations spécifiques qu'ils donnent avec la ninhydrine en solution à 0,5 p. 100 dans le butanol saturé d'eau et contenant 30 cm³ de collidine et 20 cm³ de lutidine par litre (DENT, 1948).

Le calcul des quantités d'acides aminés est fait par comparaison des résultats avec les courbes étalons établies après chromatographie de solutions pures d'acides aminés.

Chaque dosage est répété au moins 2 fois. Si les différences n'excèdent pas 10 ou 15 p. 100, les résultats sont considérés comme satisfaisants. Sinon, les dosages sont recommencés jusqu'à l'obtention de résultats ne s'écartant pas davantage.

Au cours de chaque série, on introduit sur les chromatogrammes un étalon alanine (5 μl par feuille). Cet étalon permet de comparer les intensités de coloration entre les différentes chromatographies.

Précision des résultats obtenus dans le dosage des acides aminés libres.

Pour les acides aminés libres suivants : acide aspartique, acide glutamique, alanine, acide γ aminobutyrique, sérine, glycine, dosés après séparation chromatographique, les résultats sont d'une bonne précision : ± 10 p. 100. Les résultats sont beaucoup moins satisfaisants pour les acides aminés soufrés et les acides aminés basiques.

Il ne peut être question, en raison de la complexité des manipulations et de la variabilité des échantillons, d'interpréter les variations inférieures à 50 p. 100.

EXPÉRIENCES ET RÉSULTATS

1re EXPÉRIENCE.

Les résultats figurent dans le tableau I et la figure 1.

TABLEAU I

Variations du poids de substance fraîche, du poids de substance sèche (en g) et des formes azotées (en mg) au cours de la formation de l'épi.

Résultats calculés pour 10 épis.

	8-6-54 Sortie épi	15-6-54 Anthèse	22-6-54	29-6-54	6-7-54 Grain laiteux	13-7-54 Épi jaune, courbe	20-7-54 Épi jaune, grain dur
Poids substance fraîche ..	15,37	15,20	15,15	22,65	24,70	25,50	24,15
Poids substance sèche	4,76	4,50	5,13	8,80	11,13	13,38	13,83
Teneur en eau p. 100 part. subst. sèche	340	375	196	156	122	116	75
N protéique	69,5	55,0	50	106	142	215	214,8
N des amides totales	6,0	5,5	5,0	6,3	5,8	8,3	8,8
N de l'asparagine........	6,0	5,5	5,0	6,3	5,8	8,3	8,8
N des amino-acides	8,0	12,6	14,3	13,4	15,7	15,7	10,0
N pte phosph. tungst.....	0	0	0	3,4	15,7	24,0	16,5
N org. soluble...........	28,2	31,4	31,6	40,7	45,9	47,1	38,6
N org. total	97,7	86,4	81,6	146,7	187,9	262,1	253,4
N ammoniacal	3,8	3,6	3,6	4,5	4,7	3,8	4,1
N nitrique	7,6	5,8	4,3	6,9	4,4	6,1	3,8
N soluble total	39,6	40,8	39,5	52,1	55	57	46,5
N total	109,1	95,8	89,5	158,1	197	272	261,3
R. : N protéique / N org. soluble	2,45	1,75	1,58	2,60	3,1	4,55	5,55

Variations du poids de substance sèche et de la teneur en eau.

Le poids de substance sèche, stable avant l'anthèse, augmente rapidement ensuite jusqu'à ce que l'épi jaunissant se recourbe parallèlement au chaume, puis il devient à peu près constant jusqu'à la fin, les migrations de glucides et de substances azotées étant terminées.

Variations des formes azotées.

N protéique.

Pendant les deux premières semaines, on observe une légère, mais nette diminution de la quantité d'azote protéique. Puis, brusquement, après l'anthèse, les protéines s'accumulent dans l'épi.

Dès que l'épi est courbe et jaune, et le grain dur, la quantité d'azote protéique ne varie plus.

A la fin de la période d'augmentation active, qui s'échelonne sur trois semaines, la quantité d'N protéique existante est quatre fois plus élevée qu'au début.

On observe donc une protéolyse dominante avant l'anthèse, suivie d'une protéogénèse dominante jusqu'à ce que l'épi jaunisse, puis l'accroissement s'arrête.

N organique soluble.

Les quantités d'azote organique soluble augmentent pendant la deuxième période végétative correspondant à l'élévation de l'N protéique.

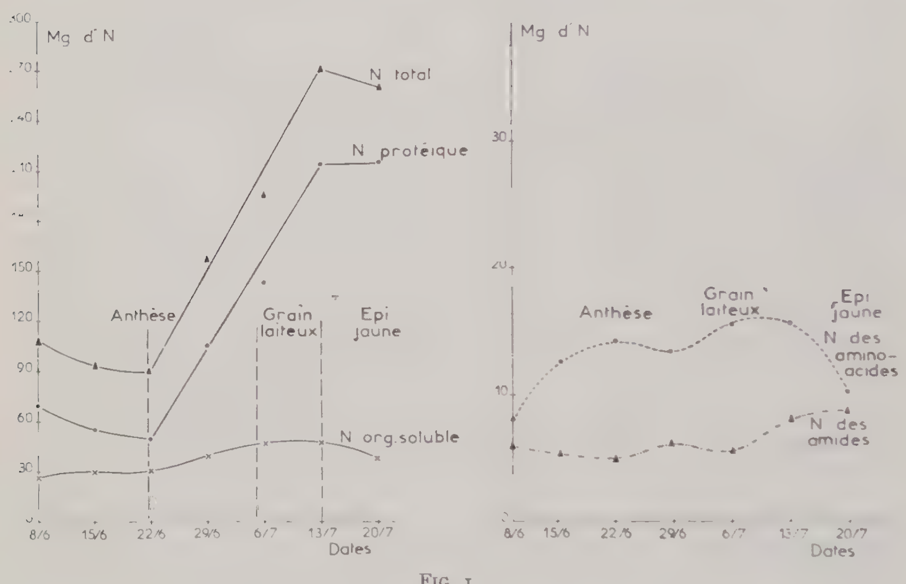


FIG. 1.

Une partie de cet azote provient des organes sous-jacents, notamment des limbes foliaires, ainsi que l'ont montré les diminutions des quantités d'azote constatées dans ces organes.

Les valeurs du rapport $\frac{\text{N protéique}}{\text{N org. soluble}}$ soulignent l'importance de ces migrations durant cette période de protéogénèse.

Cet azote organique soluble est essentiellement constitué d'amino-acides et de substances précipitables par le réactif phosphotungstique.

N du précipité phosphotungstique.

A l'augmentation de l'azote protéique correspond une augmentation de cette forme azotée représentée par des polypeptides, probablement des uréides, des bases puriques et de la choline abondants dans les graines en formation.

N des amino-acides.

Pendant la première période, alors que la protéolyse domine, la quantité d'N des amino-acides augmente. Ensuite, lors de l'accumulation des protéines, les quantités d'N restent constantes, l'apport et la synthèse d'une part, la vitesse de la condensation des amino-acides dans les protéines d'autre part, étant très rapides. Enfin, dès l'apparition de la période stationnaire, située à la fin de l'expérience, la quantité d'azote des amino-acides diminue, les transports de substances cessant à peu près complètement dans la plante.

N des amides.

Pendant la période de protéolyse dominante du début, bien que les amino-acides soient abondants, la quantité d'amides est faible et reste constante. Cette constance se maintient pendant la majeure partie de la deuxième période végétative et elle est suivie d'une légère augmentation lors de la maturation.

On n'observe pas d'oxydations intenses comme dans les germinations. Il est vraisemblable que les oxydations se ralentissent dans ces organes en voie de déshydratation.

La présence de glutamine n'a été observée qu'une fois, les valeurs obtenues sont imputables essentiellement aux variations de l'asparagine.

N organique total.

Les quantités d'N organique total suivent assez fidèlement les variations de l'N protéique, les quantités d'N organique soluble variant peu.

N minéral.

L'azote ammoniacal est à peu près constant pendant toute la durée de l'expérience. Il en est de même de l'N nitrique. Leurs valeurs sont toujours faibles.

N total.

L'azote total s'élève considérablement pendant la deuxième période végétative.

Son augmentation est due essentiellement à celle de l'N organique total.

Cette augmentation a lieu dès la fin de l'anthèse et jusqu'à ce que l'épi jaunisse et que le grain commence à durcir en prenant un aspect corné. Elle traduit l'abondance des synthèses « *in situ* » et la condensation des substances solubles d'origine foliaire.

En résumé, l'examen des résultats obtenus permet de distinguer au cours de la croissance et de la formation de l'épi trois périodes principales :

1° La première (du 8-6-54 au 22-6-54) débute au moment où l'épi est entièrement dégagé du chaume et s'arrête après l'anthèse alors que les sacs polliniques sont apparents hors des enveloppes du grain.

Elle est caractérisée par une protéolyse dominante comparable à celle qui est observée alors dans les feuilles. Cependant, les quantités de substances azotées y sont beaucoup plus élevées.

2° La deuxième (du 22-6-54 au 13-7-54) s'étend de l'anthèse jusqu'au moment où le grain laiteux atteint son volume maximum. C'est essentiellement une période de protéogénèse dominante et d'accumulation des réserves protidiques et glucidiques.

Les parties vertes de la plante s'appauvrissent en substances azotées qui émigrent vers les grains en formation.

3° La troisième (13-7-54-20-7-54) est caractérisée par la déshydratation du grain qui prend un aspect corné. Les quantités d'azote restent constantes alors que l'accumulation des glucides continue.

Il existe une relation nette entre les migrations des substances azotées des limbes foliaires et des chaumes, et le développement de la fleur et des grains.

Dès que l'épi apparaît hors de la gaine de la feuille n° 6, on observe une exaltation de la solubilisation des protéines foliaires.

Pendant cette période, la quantité de substances azotées solubilisées dans les limbes foliaires et transportées dans l'épi en formation pour former de nouvelles protéines, ne représente pas la totalité des substances azotées migratives. Elle correspond au cinquième de la quantité totale d'azote accumulée pendant la période de protéogénèse active. Le reste des substances azotées provient des racines, des chaumes et des gaines foliaires, et l'ensemble correspond à la totalité des substances azotées migratrices, indéterminable ici, certaines parties de la plante n'ayant pas été analysées.

Carles et coll. (1956) ont observé chez le Maïs un phénomène du même ordre, la sortie des fleurs s'accompagne d'une modification du sens des variations du métabolisme azoté des feuilles et des tiges.

Puis, un peu plus tardivement, intervient dans l'épi une condensation des formes azotées solubles en protéines, l'origine de l'azote nécessaire pouvant être trouvée en partie au moins dans les protéines foliaires.

Plus loin, la participation des glumes, des barbes et du rachis à ces échanges sera examinée.

2e Expérience

L'écart de temps, en moyenne une semaine, entre les différents prélèvements n'ayant pas permis de suivre en détail certaines variations, une nouvelle série d'expériences a été faite, les prélèvements étant plus fréquents.

Elle a, de plus, été complétée par une étude des variations du métabolisme azoté provoquées par un apport d'azote en cours de végétation suivant la technique de Coïc (1949 *a* et *b*, 1953, 1956).

Cette technique d'apport d'engrais azotés est basée sur l'observation des faits fondamentaux suivants :

L'apport d'une quantité importante d'azote minéral au début de la végétation du Blé, à l'époque du tallage en particulier, crée de nouveaux besoins d'azote qui se manifestent ultérieurement. Il peut donc être nécessaire, si l'on ne veut pas par la suite que la plante souffre d'une « faim d'azote », de faire de nouveaux apports. Un apport à la montaison favorise le développement du système foliaire qui va assurer l'alimentation en protéines du grain.

En année humide, ce dernier peut être négligé sans inconvénient pour la maturation du grain, mais en année sèche, son oubli est suivi d'une diminution du rendement en grain (Coïc, 1954).

Dans cette deuxième série d'expériences, seuls les épis ont été étudiés.

Pour obtenir des lots d'organes homogènes, les essais culturaux ont été pratiqués suivant une technique d'expérimentation agricole classique : *la méthode des blocs*.

Le terrain d'expériences est divisé en huit parcelles de 10 m^2 chacune. Dans quatre parcelles réparties au hasard, les plantes ne reçoivent pas d'engrais azoté en cours de végétation : plantes N_0. Dans les quatre autres parcelles, plantes N_1, l'apport d'azote est fait sous la forme d'une dose de NO_3NH_4 apportant 30 kg d'azote à l'hectare.

Cet apport de NO_3NH_4 est pratiqué par poudrage sur le sol entre les lignes de plantes et enfouissement par un léger binage le 7 juin, alors que les barbes de l'épi sont à cinq centimètres du haut du chaume.

On admet que les prélèvements faits sur ces différentes parcelles reflètent d'une manière fidèle les différents phénomènes à observer sur l'ensemble de l'essai.

Le 10 juin, les barbes ont dépassé l'extrémité des chaumes. L'épi est complètement dégagé le 16 juin. Les prélèvements sont effectués tous les deux ou trois jours à partir du 21 juin.

En 1955, les conditions météorologiques furent très différentes de celles de 1954 : le temps fut très froid et pluvieux pendant toute la période de la formation de l'épi et de maturation du grain. Il est probable que certaines particularités constatées dans les différentes variations des formes azotées sont imputables à ces mauvaises conditions de culture.

Résultats.

Les résultats obtenus sont indiqués dans les tableaux II et III et les courbes représentatives sur les figures 2, 3 et 4.

TABLEAU II

Variations du poids de substance fraîche, du poids de substance sèche (en g) et des formes azotées (en mg) au cours de la formation de l'épi.

Résultats calculés pour 10 épis. Plantes N_0.

	21/6 1955	24/6 1955	27/6 1955 Anthèse	30/6 1955	2/7 1955	4/7 1955	6/7 1955 Grain laiteux	8/7 1955	11/7 1955	13/7 1955 Jaunisst	15/7 1955	18/7 1755 G. dur
Poids subst. fraîche ..	13,45	12,75	13,6	14,9	16,9	17,5	17,7	22,7	23,3	21,7	23,0	23,3
Poids subst. sèche....	3,6	3,45	4,06	4,30	4,30	5,11	5,24	7,39	8,1	7,45	8,42	8,11
Teneur en eau p. 100. par. subst. sèche.....	270	270	235	245	290	242	238	195	185	192	174	176
N protéique	56	50	53,4	55,5	71,5	65	82	87,2	109	110	112	112
N des amides inst. ...	1,0	0	2,4	0,5	3,4	2,4	1,0	2,5	0,8	2,4	1,2	0,5
N des amides totales .	3,3	5,2	5,1	4,7	7,0	6,1	3,6	7,5	5,6	7,2	6,6	9,5
N des l'asparagine ...	2,3	5,2	2,7	4,2	3,6	3,7	2,6	5,0	4,8	4,8	5,4	9,0
N des amino-acides ..	20	13,7	11,3	13,8	16,2	21,6	28,4	22,9	24,7	23,8	23,0	16,4
N p^te^ phosph. tungst..	0	4,8	0	0	0	2,4	6,2	3,3	3,0	0,0	0	4,5
N org. soluble	34,6	32,8	26,5	38,4	36,9	33,4	37,4	41,5	47,0	48,1	43,7	43,4
N org. total	90,6	82,8	79,9	93,9	108,4	98,4	119,4	128,7	156,0	158,1	155,7	155,4
N ammoniacal	0,9	1,1	1,4	1,3	1,5	1,8	1,6	2,5	2,6	2,7	2,1	2,4
N nitrique...........	2,0	2,1	3,7	3,9	3,1	6,4	2,7	4,0	4,4	5,2	5,2	5,2
N soluble total	37,5	36,0	31,6	43,6	41,5	41,6	41,7	48	54	56	52	51
N total	93,5	86,0	85,0	99,1	113,0	106,6	123,7	135,2	163	166	164	163
R. : N protéique / N org. solubre ..	1,62	1,52	2,0	1,44	1,94	1,94	2,2	2,1	2,3	2,3	2,5	2,6

TABLEAU III

Variations du poids de substance fraîche, du poids de substance sèche (en g) et des formes azotées (en mg) au cours de la formation de l'épi.

Résultats calculés pour 10 épis. Plantes N_1

	21/6 1955	24/6 1955	27/6 1955 Anthèse	30/6 1955	2/7 1955	4/7 1955	6/7 1955 Grain laiteux	8/7 1955	11/7 1955	13/7 1955	15/7 1955 Jauniss.[1]	18/7 1955	20/7 1955 Grain dur
Poids subst. fr. .	14,9	13,7	13,5	17,2	17,1	19,9	17, 2	22,3	23,8	24,2	24,9	24,6	25,7
Poids subst. s. ..	4,14	3,75	4,0	4,9	5,15	5,85	5,8	7,85	8,15	9,81	10,5	10,6	11,3
Teneur eau p. 100 parties subst. sèche	260	265	240	255	235	240	200	172	192	144	139	132	123
N protéique	67,3	60,6	57,5	76,2	67,2	75,0	86,5	120	120	143,8	156	176	182
N amides inst...	3,1	0,9	2,4	0	2,9	1,6	3,7	2,1	1,8	2,4	4,8	1,8	0
Namides tot. ..	4,5	4,8	5,5	5,9	8,4	6,3	7,3	7,5	9,0	6,0	8,1	7,3	2,4
N asparagine ...	1,4	3,9	3,1	5,9	5,5	4,7	3,6	5,4	7,2	3,6	3,3	5,5	2,4
N amino-ac.	23,1	12,9	11,1	25,2	18,0	26,5	41,0	30,4	27,0	20,7	17,4	19,0	16,2
N p^te^ phos. tungst	0	0	0	0,4	2,9	0	0	9,6	4,5	1,8	2,4	7,2	5,1
N org. soluble ..	28,0	27,1	34,6	38,4	45,0	37,9	54,6	68,6	54,6	40,0	49,4	36,5	35,6
N org. total	95,3	87,7	92,1	114,6	112,2	112,9	141,1	188,6	174,6	183,8	205,4	212,5	217,6
N ammoniacal ..	0,85	1,4	1,2	2,4	1,8	1,8	1,2	2,0	2,7	3,3	2,4	2,7	2,1
N nitrique	4,8	3,5	4,1	4,0	3,2	8,3	4,1	2,9	5,7	3,7	4,2	4,3	2,3
N soluble total .	33,6	32	40	44,8	50,0	48,0	60	73,5	63	47	56	43,5	40
N total	100,9	92,6	97,5	121,0	117,2	123,0	146,5	193,5	183	190,8	212	219,5	222
R. : N protéique / N org. sol.	2,4	2,25	1,66	1,98	1,5	1,98	1,6	1,75	2,2	3,6	3,2	4,85	5,1

Variations du poids de substance sèche et de la teneur en eau.

Les épis des plantes N_1 sont toujours plus riches en substance sèche que ceux des plantes N_0 aux différentes périodes. De plus, l'augmentation de poids a lieu jusqu'à la fin de l'expérience, alors qu'avec les plantes N_0 une légère diminution se remarque quinze jours avant le jaunissement complet.

La teneur en eau des épis est toujours plus élevée pour les plantes N_0 et elle diminue plus lentement lors de la maturité que pour les plantes N_1. La déshydratation des épis de ces dernières se poursuit très régulièrement jusqu'à la fin de l'expérience.

Dans les deux cas, l'amplitude des variations de la teneur en eau est beaucoup plus faible que dans l'expérience précédente. Les conditions climatiques défavorables, le temps très pluvieux et froid, en sont vraisemblablement responsables.

Variations des formes azotées.

N protéique (fig. 2).

Dans la première période se remarque une légère protéolyse, comparable à celle qui a été observée lors de l'expérience précédente.

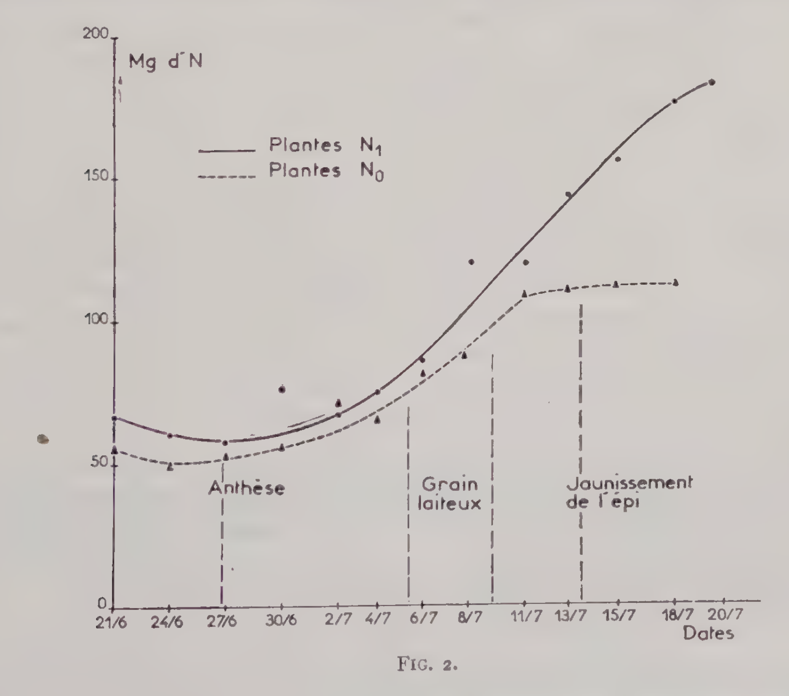


FIG. 2.

Dès l'anthèse, la protéogenèse est dominante, avec une amplitude comparable dans les deux lots de plantes.

Cependant, il existe une grande différence à propos des teneurs en azote protéique entre les deux types. En effet, si les plantes se comportent toutes de la même façon jusqu'à ce que les épis aient atteint leur taille définitive, les plantes N_0 présentent ensuite une grande stabilité de leur teneur en N protéique alors que les plantes N_1 s'enrichissent encore en protéines d'une manière considérable.

L'augmentation continue de l'azote protéique dans les plantes N_1 est liée également au fait qu'elles restent vertes plus longtemps, l'apport d'azote tardif favorisant la poursuite d'un développement des organes végétatifs.

N organique soluble.

Le sens des variations de l'N organique soluble est différent si l'on compare les deux catégories de plantes.

Les plantes N_0 sont aussi riches que les plantes N_1 avant l'anthèse. Ensuite, leurs quantités d'azote organique soluble augmentent avec quelques fluctuations jusqu'au jaunissement de l'épi mais dans des proportions aussi importantes, puis les quantités ne varient plus jusqu'à la maturité du grain.

Chez les plantes N_1 les quantités d'azote organique soluble augmentent plus rapidement et atteignent leur maximum au début du jaunissement de l'épi quand le grain est devenu laiteux.

Les valeurs du rapport $\frac{\text{N protéine}}{\text{N org. soluble}}$ rendent compte de la vitesse relative de la protéogenèse comparée à la vitesse globale de l'apport d'N soluble. Ce rapport est peu variable dans les épis des plantes N_0. Ses variations sont de plus grande amplitude dans les plantes N_1. Des valeurs très élevées s'observent dans la dernière période végétative. La condensation des substances azotées solubles et l'accumulation des protéines est alors très active alors que la synthèse de ces substances solubles à partir de l'alimentation minérale est déjà très ralentie dans les tissus sénescents de la plante.

N du précipité phosphotungstique.

Contrairement aux résultats obtenus en 1954, les variations observées pour les formes azotées précipitables par l'acide phosphotungstique sont peu importantes dans les deux cas. On observe deux maximums, l'un lorsque le grain est laiteux et l'autre lorsqu'il est dur.

N des amino-acides (fig. 3).

Dans les deux cas, on observe une diminution de 50 p. 100 de l'N des amino-acides pendant la période qui précède l'anthèse. Il est probable qu'une partie des amino-acides émigre dans les organes sous-jacents,

puisque l'N protéique diminue également pendant cette période, ou bien dans les barbes. Celles-ci sont en effet le siège d'une protéogenèse importante pendant cette période de la vie de l'épi (voir plus loin).

Pendant la deuxième période, s'étendant de l'anthèse au moment où l'intérieur du grain qui a atteint son volume normal devient laiteux, les quantités d'amino-acides augmentent de façon régulière pour les plantes N_0. Il en est de même pour les plantes N_1, le maximum atteint étant beaucoup plus élevé.

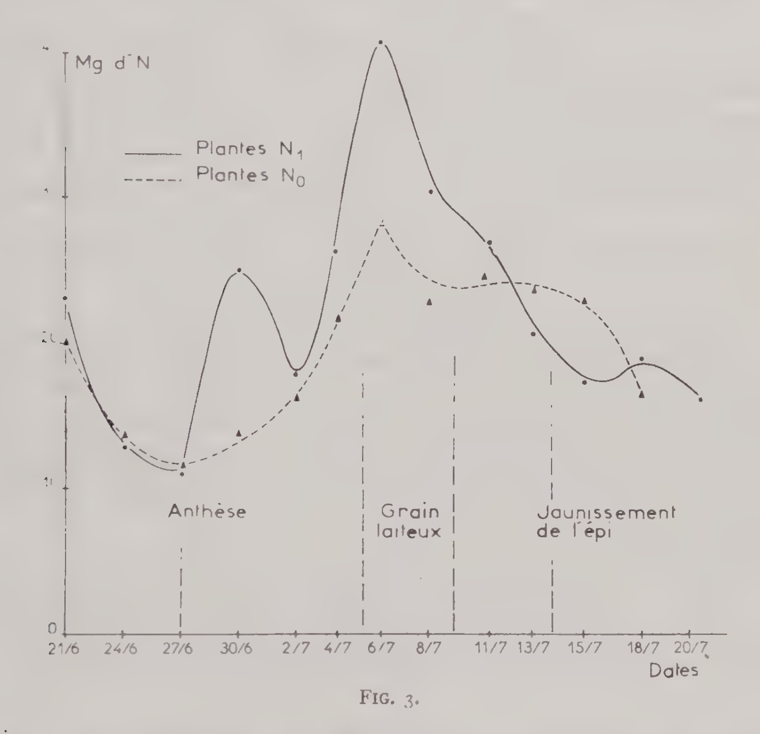


FIG. 3.

Pendant la troisième période, une diminution régulière de l'azote des amino-acides est observée. Cette période correspond essentiellement à la condensation dans les protéines.

En résumé, pour les amino-acides, les trois périodes végétatives se traduisent par des variations de même sens, que les plantes aient ou non reçu un apport d'engrais azoté. L'amplitude des variations est seulement plus grande après cet apport.

Les résultats de l'analyse des différents amino-acides séparés par chromatographie sur papier, seront exposés en détail à la fin du chapitre.

N des amides.

L'N des amides présente des variations très différentes suivant que l'on s'adresse aux plantes ayant reçu ou non de l'azote.

Pour les plantes N_1, une augmentation importante s'observe depuis le premier prélèvement jusqu'à celui qui succède à l'anthèse. Cette augmentation peut provenir d'une oxydation partielle des amino-acides libérés lors de la légère protéolyse constatée au début de cette période.

Ensuite, les teneurs en amides restent à peu près constantes jusqu'à ce que l'intérieur du grain prenne un aspect laiteux, puis diminuent jusqu'à la fin de l'expérience.

La glutamine est en quantité appréciable : elle peut représenter jusqu'à 50 p. 100 des amides totales.

Pour les plantes N_0, les quantités d'amides augmentent de la même façon quoique plus faiblement depuis le début de l'expérience jusqu'à l'anthèse, puis elles diminuent lorsque les grains sont à l'état laiteux. Elles s'élèvent à nouveau jusqu'au dernier prélèvement. Cette dernière augmentation correspond alors à la diminution de la quantité des amino-acides.

La glutamine est également présente en quantité appréciable.

N organique total.

Malgré toutes les fluctuations observées à propos des formes azotées organiques solubles, les variations de l'N organique total reproduisent assez fidèlement celles de l'N protéique. On y retrouve les caractéristiques des trois périodes végétatives observées dans l'expérience précédente avec une diminution avant l'anthèse, puis une augmentation régulière jusqu'au jaunissement de l'épi.

Pour les plantes N_0 n'ayant pas reçu d'azote, le maximum d'N organique total est atteint rapidement. L'augmentation se prolonge pour les plantes N_1 après l'apport d'engrais azoté, la condensation des protéines se poursuivant alors dans les organes maintenus à l'état de vie active.

N minéral.

L'N ammoniacal présente des valeurs du même ordre dans les deux cas et une certaine constance pendant toute la durée de l'expérience, que les plantes aient reçu ou non un apport d'azote.

L'N nitrique est moins abondant dans les plantes N_0 que dans les plantes N_1 pendant les deux premières périodes végétatives. Ensuite, ces variations sont plus irrégulières, de fortes pluies ayant troublé l'absorption des substances solubles du sol.

N total (fig. 4).

Les mêmes observations que pour l'N organique total peuvent être faites. Une diminution légère se manifeste jusqu'à l'anthèse, puis une augmentation régulière intervient jusqu'au moment où l'intérieur du grain est laiteux.

Pour N_0, les quantités ne varient plus jusqu'à la fin de l'expérience. Pour N_1, au contraire, les teneurs en N total continuent à croître jusqu'à la fin de l'expérience, avec une vitesse un peu plus faible que pendant la deuxième période végétative.

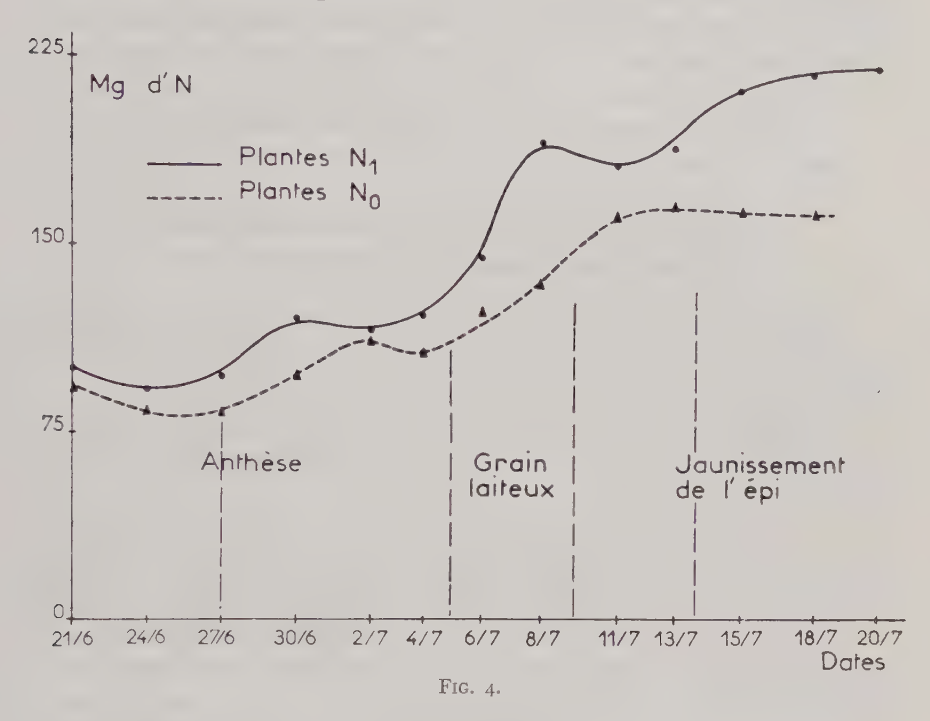


FIG. 4.

Conclusions.

Les observations que l'on peut tirer de cette expérience sont les suivantes :

Chez les plantes n'ayant pas reçu d'apport tardif d'azote, ou plantes N_0, on retrouve parfaitement les trois périodes végétatives observées dans la première expérience, quoique plus atténuées en amplitude.

A une légère protéolyse avant l'anthèse, fait suite une protéogenèse, jusqu'à ce que dans l'épi jaunissant le contenu du grain prenne un aspect laiteux, puis une stabilité de l'N protéique s'établit jusqu à la maturité du grain, tandis que l'azote soluble diminue.

Chez les plantes ayant reçu un apport d'azote lors de l'épiaison, les deux premières périodes sont les mêmes avec seulement plus d'amplitude dans les variations de la vitesse de la protéogenèse caractéristique de la deuxième période. Par contre, l'augmentation de la quantité d'N protéique se prolonge jusqu'à la maturité du grain. En même temps, l'apport d'azote favorise la prolongation de l'activité des organes végétatifs qui restent verts plus longtemps. L'augmentation de leurs poids

de substance sèche est alors encore sensible, l'équilibre minéral étant maintenu pendant une longue durée (CARLES et coll., 1957).

PERCIVAL (1921) et CARLES et coll. (1955) ont indiqué également que chez le Blé, l'épi est construit embryologiquement vers la fin du tallage et se développe à la fin de la montaison. De ce fait, seul l'apport d'azote tardif à la fin de la montaison augmente le taux protéique du grain ainsi que la teneur en substance sèche.

Les résultats obtenus montrent que cette observation s'applique également à l'Orge.

Examen de la répartition des substances azotées dans les différentes parties de l'épi.

Afin de préciser les variations de métabolisme azoté dont sont l'objet les enveloppes du grain et les parties végétatives de l'épi, l'expérience suivante a été réalisée.

Des épis de plantes cultivées en plein air ont été prélevés et les différentes parties : barbes, glumes et glumelles, et enfin grains, ont été analysées séparément.

TABLEAU IV

Variations du poids de substance fraîche, du poids de substance sèche (en g) et des formes azotées (en mg)

Résultats calculés pour 10 épis.

	15 jours après anthèse			Grain laiteux, épi jaune courbe		
	Grains	Glumes + glumelles	Barbes	Grains	Glumes + glumelles	Barbes
Poids de subs. fraîche	3,98	1,33	5,84	21,4	0,91	1,1
Poids de subs. sèche	1,06	0,54	2,20	7,1	0,45	0,75
Teneur en eau pour 100 parties subs. sèche	275	146	166	200	104	46,5
N protéique	20	11,5	35,5	110	7,55	5,2
N des amides inst.	0	0	1,0	2,1	0,4	0
N amides totales	1,5	1,3	2,90	5,2	1,3	1,1
N asparagine	1,5	1,3	1,90	3,1	0,9	1,1
N amino-acides	2,5	3,8	4,7	20,7	1,2	1.1
N p^{rte} phospho. tung^{t}	0	0	0	9,4	0	0
N org. soluble	20,1	13,5	23,5	44	3,0	3,1
N org. total	40,1	24,0	59,0	154	10,5	8,3
N ammoniacal	1,6	0,4	1,0	2,7	0,6	0,3
N nitrique	5,1	2,9	5,0	5,3	1,0	0,4
N soluble total	26,8	16,8	29,5	52	4,6	3,8
N total	46,8	28,3	65	162	12,1	9,0

Cet examen a été fait à deux périodes. La première se situe quinze jours après l'anthèse, dès qu'il est possible de séparer les grains en tota-

lité sans pertes. La deuxième à la fin du stade du grain laiteux, dès que le grain se déshydrate et commence à durcir.

Les résultats des analyses correspondantes sont réunis dans le tableau IV.

Le poids de substance sèche des graines augmente ; par contre, celui des enveloppes diminue légèrement et celui des barbes s'abaisse dans des proportions plus importantes.

En ce qui concerne les substances azotées, les quantités d'N protéique diminuent dans les enveloppes et sont faibles au moment du jaunissement de l'épi.

Dans les barbes, à ce moment, les quantités d'N protéique ainsi que celles de l'N total et de l'N organique soluble sont très faibles, l'N ayant émigré et ayant été utilisé dans la constitution des réserves protéiques des grains.

Dans les glumes et les glumelles, le phénomène est le même, mais avec moins d'amplitude.

Les enveloppes, et les barbes, contiennent donc une réserve azotée importante utilisable très rapidement dans la protéogenèse intense qui a lieu dans le grain.

Le rôle important des barbes dans la physiologie de l'Orge et du Blé a été entrevu par HICKMAN en 1889. Il a indiqué, de plus, que les Blés barbus qu'il a étudiés ont un rendement plus élevé que les Blés non barbus sur lesquels il expérimentait.

ZOEBL et coll. (1892) trouvent que les barbes de l'Orge sont des organes de forte transpiration dont l'importance est en relation directe avec l'intensité du métabolisme dans l'épi ; 67 p. 100 de la transpiration se fait par les barbes.

E. W. SCHULZE en 1913, indique également que les Orges avec barbe transpirent plus que les Orges sans barbes ou ébarbées artificiellement. Le maximum de transpiration est atteint au stade du grain laiteux.

Il a été établi par AUMULLER (1921) que les barbes d'Orge possèdent des fonctions d'assimilation importantes et, en 1944, MILLER et coll. étudiant l'action de l'ébarbage partiel ou total chez le Blé, observent dans les deux cas, une diminution du poids de 1000 grains et une diminution du nombre de grains par épi. Par contre, le poids de cendres du reste de l'épi ne varie pas et le poids des glumes augmente pour certaines variétés après ébarbage, tandis qu'il diminue pour d'autres.

ASANA et coll. (1950) constatent que chez le Blé, en plus des produits résultant de la photosynthèse dans l'épi, les substances migratrices venant des feuilles et des chaumes contribuent substantiellement à la formation des réserves du grain. Il faut même observer que certaines variétés n'ont pratiquement pas d'activité photosynthétique dans l'épi.

Reprenant ces travaux en 1955, les mêmes auteurs mettent en évi-

dence que la contribution photosynthétique de l'épi au grain en formation, et en relation, chez le Blé, avec la présence de barbes et la différence du nombre d'épillets pendant la période suivant l'épiaison.

La même année, CARLES indique que, chez le Blé également, les glucides quittent le rachis et les glumes pour émigrer vers le grain en formation au moment du jaunissement de l'épi.

Les résultats indiqués ci-dessus montrent également le rôle important tenu par les enveloppes et principalement par les barbes dans la création des réserves protéiques du grain. Ces parties végétatives constituent des réserves temporaires utilisées au moment de la maturation, réserves qui sont immédiatement mobilisées après hydrolyse, dès que les besoins sont importants, pour constituer les protéines du grain.

Cette hydrolyse des protéines dans les enveloppes des graines n'est pas nécessairement en relation avec la déshydratation. Le comportement de ces enveloppes ne peut être simplement assimilé à celui des feuilles chez qui la protéolyse accompagne la déshydratation lors de la sénescence (PETRIE et coll., 1938).

En effet, RAACKE (1957) a indiqué que chez *Pisum sativum*, l'hydrolyse des protéines des gousses a lieu alors que la teneur en eau reste constante.

Étude des variations de quelques acides aminés libres

Cette étude concerne les principaux amino-acides isolés dans les extraits solubles par chromatographie sur papier et dosés suivant la méthode de THOMPSON et coll. (1951*a* et *b*).

TABLEAU V

Variations des quantités d'acides aminés libres au cours de la formation de l'épi.

Résultats exprimés en mg d'acide aminé pour 10 épis. Plantes N_0.

T = traces non dosables.

	1955 21-6	1955 24-6	1955 27-6	1955 30-6	1955 2-7	1955 4-7	1955 6-7	1955 8-7	1955 11-7	1955 15-7	1955 18-7
			Anthèse				Grain laiteux			Jauniss[t]	
Alanine	5,0	4,6	11,2	12,4	17,4	19,4	14,0	16,0	13,2	6,6	13,2
Ac. aspartique	T	1,7	1,9	4,1	6,9	T	3,2	5,6	7,5	1,2	5,0
Ac. glutamique	1,5	2,6	3,6	11,2	13,8	5,5	10,5	11	8,9	1,3	1,2
Ac. γ-am. but.	6,4	6,0	5,2	25,4	34,5	52	8,2	15,2	17,8	4,4	2,4
Glycine	0,2	0,1	1,5	1,5	1,1	2,9	3,0	3,0	0,9	0,7	1,9
Sérine	2,3	T	1,1	11,7	11,6	13	14,2	16,4	4,2	1,4	1,4
Thréonine	T	T	0,3	0,4	0,5	0,1	0,3	0,3	0,2	0,2	0,4
Proline	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
Valines	1,0	0,9	0,6	3,5	0,5	3,7	8,2	2,4	1,8	1,7	3,6
Leucines	1,2	0,06	0,3	3,3	0,2	5,9	0,4	1,5	0,8	0,6	3,9
Méthionine	0,8	0,8	0,7	1,2	1,8	0,9	1,1	1,3	T	0,6	1,5

Les acides aminés dosés sont les suivants : alanine, acide aspartique, acide glutamique, acide γ-aminobutyrique, arginine, sérine, glycine, thréonine, tyrosine, proline, valine, leucine, méthionine.

La cystine, la cystéine, le tryptophane, en raison de leur labilité, n'ont pas été dosés.

La valine correspond en fait à la somme : valine + norvaline ; de même, la leucine correspond à la somme : leucine, isoleucine et norleucine.

Les résultats des dosages sont donnés dans les tableaux V et VI pour les plantes N_0 et N_1 de l'expérience faite sans apport d'azote (N_0), ou avec apport de NO_3NH_4 (N_1) à l'épiaison. Les résultats sont exprimés en milligrammes de l'acide aminé étudié pour 10 épis.

TABLEAU VI

Variations des quantités d'acides aminés libres au cours de la formation de l'épi.

Résultats exprimés en mg d'acide aminé pour 10 épis. Plantes N_1

T = traces non dosables.

Dates :	1955 21-6	1955 24-6	1955 27-6 An-thèse	1955 30-6	1955 2-7	1955 4-7	1955 6-7 Grain laiteux	1955 8-7	1955 11-7	1955 13-7	1955 15-7 Jau-niss[t]	1955 18-7	1955 20-7 Grain dur
Alanine	16,6	13,5	15	19,2	16,5	22,7	38,8	15,4	12,5	6,3	9,1	2,5	9,2
Ac. aspartique	T	2,2	2,5	9,2	0,5	3,8	11,6	0,7	1,4	3,2	1,1	1,8	1,9
Ac. glutamique	2,0	3,0	10	10,8	3,5	6,7	11,5	5,1	6,6	4,8	7,2	2,8	6,0
Ac. γ-am. but.	27,8	16,7	20,0	46	25	30	69	15,6	5,5	0,4	1,6	6,1	10,3
Glycine	T	0,4	2,0	1,3	1,2	3,3	2,3	2,2	1,4	0,4	1,5	1,3	2,2
Sérine	T	0,4	9,5	3,4	1,4	10,8	19,3	11,4	7,7	3,7	3,8	2,7	5,0
Thréonine	T	1,9	0,3	T	2,0	5,0	3,8	1,8	1,2	0,5	0,3	0,5	1,1
Proline	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
Valines	3,4	0,9	2,3	4,6	3,7	5,2	6,3	2,6	2,5	0,5	0,9	0,2	2,2
Leucines	2,1	0,4	2,5	4,2	3,0	4,2	2,3	2,6	1,4	0,6	0,7	0,2	2,4
Méthionine	0,5	0,5	1,5	1,7	1,0	1,4	1,0	T	1,2	T	T	T	T

Cinq acides aminés sont toujours très abondants. Ce sont : l'alanine, les acides aspartique, glutamique et γ-aminobutyrique, et la sérine. Ils forment ensemble 85 p. 100 de l'N aminé total, l'N aminé des amides étant exclu.

Résultats.

Alanine.

L'alanine dosée est l'α-alanine. La β-alanine est présente assez rarement parmi les acides aminés libres des feuilles ; CHAMPIGNY et coll. (1955) ont signalé son absence à l'état libre dans les feuilles de Blé alors qu'elle est présente dans ces mêmes feuilles dans la fraction polypeptidique.

Dans les deux lots de plantes étudiées, on observe une diminution légère des quantités d'alanine pendant la première période végétative,

puis une augmentation rapide pendant la période de protéogenèse active jusqu'au stade du grain laiteux, enfin une diminution qui intervient au cours de la maturation.

Cette dernière diminution correspond, pour une partie au moins, à l'incorporation de l'alanine dans les protéines du grain. Elle est plus rapide chez les plantes N_1 que chez les plantes N_0.

Acide aspartique.

Dans les deux lots de plantes les variations quantitatives de l'acide aspartique sont similaires. Les quantités les plus élevées sont atteintes au cours de la deuxième période végétative.

La diminution, lors de la maturation, correspond à l'incorporation d'une fraction de l'acide aspartique dans les protéines du grain. Elle est beaucoup plus rapide pour les plantes N_1 que pour les plantes N_0.

Cependant, dans les protéines spécifiques de l'Orge, telles que l'hordéine, on trouve une quantité assez faible d'acide aspartique (1,2 p. 100 de l'N protéique total d'après KLEINSCHMITT, 1907).

Il est probable qu'une grande partie de l'acide aspartique disparu se trouve transformée en acide glutamique. LEONARD et coll. (1947) ont mis en évidence la présence de transaminases dans les épis de Graminées.

Acide glutamique.

Jusqu'à l'anthèse, les quantités d'acide glutamique libre croissent dans les deux types de plantes N_0 et N_1. Puis l'on observe une diminution correspondant à l'augmentation importante de l'acide γ-aminobutyrique avant le stade du grain laiteux. A partir de ce stade, les quantités d'acide glutamique augmentent de nouveau. Elles diminuent ensuite jusqu'à la fin de la maturation des les plantes N_0 et restent à peu près constantes dans les plantes N_1, l'intégration de l'azote minéral se poursuivant.

Contrairement à l'acide aspartique, l'acide glutamique existe en quantité importante dans l'hordéine qui en renferme environ 38 p. 100 (BLOCK, 1951).

Acide γ-aminobutyrique.

Cet acide aminé, résultant de la décarboxylation de l'acide glutamique, est celui qui existe en plus grande quantité dans les deux types de plantes.

BEEVERS (1951) a montré dans l'Orge l'existence d'une décarboxylase de l'acide glutamique. Celle-ci permet de comprendre la présence de quantités aussi importantes d'acide γ-aminobutyrique dans les organes étudiés, une partie de l'acide glutamique étant décarboxylée.

Les deux types de plantes se comportent de façon très différente.

Chez les plantes N_1, les quantités d'acide γ-aminobutyrique sont élevées dès la sortie de l'épi et augmentent rapidement jusqu'au stade du grain laiteux, puis diminuent jusqu'avant le dernier prélèvement pour lequel on observe de nouveau une légère augmentation.

Chez les plantes N_0, par contre, avant l'anthèse, les quantités sont faibles et n'augmentent qu'à partir de ce moment et jusqu'au stade du grain laiteux. Ensuite, la diminution est de nouveau sensible jusqu'à la maturité du grain.

Il est à noter que l'acide γ-aminobutyrique n'existe pas à l'état combiné dans les protéines mais seulement à l'état libre ou dans la fraction peptidique des organes verts (CHAMPIGNY, 1955*b*).

BISERTE et coll. (1950) et SCRIBAN (1951) l'ont identifié dans les acides aminés du moût et du malt d'Orge.

Sérine.

Les quantités de sérine, faibles dans les deux types de plantes avant l'anthèse augmentent rapidement, présentent un maximum assez élevé au stade du grain laiteux puis diminuent ensuite jusqu'à la fin des prélèvements.

Glycine.

Les quantités de glycine présentes dans les amino-acides libres sont toujours très faibles.

Il est à remarquer parallèlement que les teneurs en glycine des protéines spécifiques de l'Orge sont très faibles. Dans l'hordéine, par exemple, la glycine n'existe qu'à l'état de traces.

Thréonine.

La thréonine libre existe toujours en quantités très faibles dans les deux cas. L'apport d'azote sur les plantes N_1 provoque une augmentation légère des quantités de thréonine au stade du grain laiteux.

Proline.

La proline libre, toujours existante dans les deux types de plantes, ne se trouve qu'à l'état de traces. On n'observe pas d'accumulation au stade du grain laiteux.

Valines.

Dans les deux cas, les valines libres existent en quantités assez faibles. Elles atteignent leur maximum au stade du grain laiteux. Ce maximum est un peu plus élevé en quantité pour les plantes N_1.

Leucines.

Les quantités de leucines sont toujours faibles chez les plantes N_0. Elles sont un peu plus élevées chez les plantes N_1.

Méthionine.

La méthionine présente un maximum dans les deux cas pendant la période de protéogenèse active. Les quantités de mèthionine libre sont assez peu différentes dans les deux types de plantes.

Parmi les acides aminés libres trouvés dans l'épi d'Orge en formation, cinq sont particulièrement abondants.

Ce sont : l'alanine, l'acide aspartique, l'acide glutamique, l'acide γ-aminobutyrique et la sérine.

Ils existent dans les protéines spécifiques de l'Orge en plus ou moins grande quantité, sauf l'acide γ-aminobutyrique qui ne se rencontre que dans les acides aminés libres et dans la fraction peptidique de certains extraits de feuilles.

Les relations existant dans les organes verts, entre l'alanine, l'acide aspartique et l'acide glutamique sont bien connues (VIRTANEN, 1955, STEWART et coll., 1956), ainsi que leur rôle dans les transaminations qui interviennent entre eux et de nombreux acides α-cétoniques (MEISTER, 1954-1955).

CONCLUSIONS

Après le dégagement de l'épi et pendant toute la période de formation et de maturation du grain, on peut distinguer trois périodes principales :

a) La première se situe avant la floraison. Le rachis, les glumes et les glumelles, qui se sont préalablement développés au cours de la montaison, se comportent comme des feuilles sénescentes.

La protéolyse y domine. Les quantités d'amides présentes proviennent en majeure partie directement de l'hydrolyse des protéines. Les amino-acides libérés lors de cette hydrolyse sont transportés avec les amides dans les feuilles situées immédiatement sous l'épi et dans les barbes.

b) La deuxième période débute avec la floraison et se termine au stade du grain laiteux. La protéogenèse domine alors dans l'épi, elle se situe aussi bien dans les enveloppes du grain que dans le grain lui-même. Les quantités d'azote protéique augmentent régulièrement jusqu'au stade du grain laiteux.

Au cours de cette période, les amino-acides libérés par l'hydrolyse des protéines dans les chaumes et les feuilles fournissent une partie importante sinon la totalité des matériaux utilisés dans la protéogenèse propre

à l'épi. Dans ce dernier, les amino-acides les plus abondants sont : l'alanine, l'acide aspartique, l'acide glutamique, l'acide γ-aminobutyrique et la sérine. Ils représentent plus de 85 p. 100 de l'N aminé libre.

Les autres amino-acides, glycine, thréonine, arginine, proline, valines, leucines et méthionine, sont toujours en faible quantité ainsi que les amides. Tous ces amino-acides constituent une réserve transitoire de substances organiques azotées dans la protéogenèse réalisée dans le grain.

c) La troisième période débute après le stade du grain laiteux, le grain ayant atteint sa taille maximum. La protéogenèse cesse rapidement et les quantités d'azote protéique se stabilisent. Les quantités des amino-acides et des amides libres diminuent.

Un apport mixte d'azote nitrique et ammoniacal lors de l'épiaison prolonge la durée de la protéogenèse. L'enrichissement en azote protéique n'est pas le fait d'une augmentation de la vitesse même de la protéogenèse mais bien de sa prolongation qui accompagne celle de la vie active des organes végétatifs. Ceux-ci peuvent alors assurer pendant une plus longue durée l'alimentation en azote organique des grains en formation.

RÉSUMÉ

Cette étude a permis de mettre en évidence trois périodes essentielles au cours de la formation de l'épi et de la maturation du grain.

La première située avant la floraison, pendant laquelle les parties vertes de l'épi, sauf les barbes, se comportent comme des feuilles senescentes, avec protéolyse dominante et transport des éléments solubilisés dans les feuilles sous-jacentes et les barbes.

La deuxième, comprise entre la floraison et le stade du grain laiteux, est caractérisée par une protéogenèse dominante et présence de quantités très importantes d'acides aminés libres dont l'acide γ amino butyrique représente 45 p. 100 environ.

La troisième, allant jusqu'à la maturité du grain où la protéogenèse cesse rapidement et où les quantités d'azote protéique se stabilisent.

Un apport d'azote effectué à la montaison permet la continuation de la protéogenèse, de façon active, pendant cette 3e période.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Asana (R. D.) et Mani (V. S.). — Studies in physiological analysis of yield. I. Varietal differences in photosynthesis in the Leaf, Stem and Ear of Wheat. *Physiol. Plantarum*, **3**, 22-39, 1950.

Asana (R. D.) et Mani (V. S.). — Studies in physiological analysis of yield. II. Further observations on varietal differences in photosynthesis in the Leaf, Stem and Ear of Wheat. *Physiol. Plantarum*, **8**, 8-19, 1955.

Aumüller (F.). — Die Bedeutung der Gerstengrannen. *Illus. Landw. Ztg.*, **41**, 273-274, 1921.

Beevers (H.). — An L-glutamic acid de carboxylase from Barley. *Bioch. Journ.*, **48**, 132-137, 1951.

Biserte (G.) et Scriban (R.). — Les protides de l'Orge. *Bull. Soc. chim. biol.*, **32**, 959-968, 1950.

Block (R. J.). — Some amino-acids, peptides and amines in milk, concentrated milks, and cheese. *Journ. Dairy Sc.*, **34**, 1-10, 1951.

Boulanger (P.) et Biserte (G.). — Chromatographie sur papier des acides aminés et polypeptides dans les liquides biologiques. Modifications techniques et résultats nouveaux sur plasma sanguin. *Bull. Soc. chim. biol.*, **33**, 1930-1939, 1951.

Carles (J.). — Les glucides du Blé. *C. R. Ac. Sc. Paris*, **241**, 1329, 1331, 1955.

Carles (J.), Soubies (L.) et Gadet (R.). — De l'importance de la date de fourniture des engrais azotés au Blé. *C. R. Ac. Sc. Paris*, **240**, 1457-1459, 1955.

Carles (J.), Soubies (L.) et Gadet (R.). — La nutrition azotée de l'épi de Maïs. *C. R. Ac. Sc. Paris*, **242**, 808-810, 1956.

Carles (J.), Soubies (L.) et Gadet (R.). — Influence d'une fourniture plus ou moins abondante d'engrais azoté sur la pénétration et la migration des éléments minéraux chez le Maïs. *C. R. Ac. Sc. Agri. Fr.*, **43**, 536-544, 1957.

Champigny (M. L.). — Métabolisme azoté et acides aminés des feuilles de *Bryophyllum Daigremontianum* Berger. *Biochemie der Kulturplanzen*. Gatersleben, 1955*a*.

Champigny (M. L.). — Les acides aminés libres, les acides aminés des peptides et des protéines dans les feuilles de *Bryophyllum Daigremontianum* Berger. *C. R. Ac. Sc. Paris*, **240**, 1257-1259, 1955*b*.

Champigny (M. L.). — Formation des amino-acides au cours de la photosynthèse. *IIe Colloque Int. sur la qualité végétale, Paris*. Avril 1957, 1957.

Champigny (M. L.). — Etude du métabolisme de l'acide glutamique dans les feuilles et les racines de *Bryophyllum Daigremontianum* Berger à l'aide de l'acide 1 et de l'acide 3.4 C^{14}. *C. R. Ac. Sc. Paris*, **246**, 626-629, 1958.

Champigny (M. L.) et Lioret (Cl.). — Sur la présence de β alanine dans les tissus des plantes supérieures. *Experientia*, 11, 354-355, 1955.

Champigny (M. L.) et Lioret (Cl.). — Utilisation de l'acide glutamique par des tissus et organes de plantes supérieures. *Comm. Soc. fr. Phys. vég.*, 15 février, 1958.

Chibnall (A. C.). — Protein métabolism in the plant. *Yale University Press. New Haven*, 1939.

Coïc (Y.). — L'apport à dose normale et à une époque favorable d'engrais azotés immédiatement assimilables peut provoquer ultérieurement un besoin supplémentaire d'azote. *C. R. Ac. Agri. Fr.*, **35**, 79-82, 1949*a*.

Coïc (Y.). — Action des engrais azotés répandus à la floraison sur l'activité assimilatrice des organes chlorophylliens du Blé d'hiver. *C. R. Ac. Agri. Fr.*, **35**, 175-177, 1949*b*.

Coïc (Y.). — La nutrition et la fertilisation azotées du Blé d'hiver. *Bull. des Engrais*, **349**, 1953.

Coïc (Y.). — Que pouvons-nous espérer de la fertilisation azotée semi-tardive du Blé d'hiver. *C. R. Ac. Agri. Fr.*, **40**, 214-218, 1954.

Coïc (Y.). — La nutrition et la fertilisation du Blé d'hiver. I. Les besoins en azote eu Blé d'hiver. Conséquences agronomiques. *Ann. Agro. I. N. R. A.*, 115-131, 1956.

Consden (R.) et Gordon (A. H.). — Effects of salts on partition chromatograms. *Nature*, Londres, **162**, 180-181, 1948.

Dent (C. E.). — A study of the behavior of some sixty amino-acids and other ninhydrin-reacting substances on Phenol. « Collidine » filter paper chromatograms, with notes as to the occurrence of some of them in biological fluids. *Bioch. Journ.*, **43**, 169-180, 1948.

Ducet (G.). — Etude des variations des différentes formes de la choline au cours de la croissance de quelques végétaux. *Thèse Doc. Sc. Nat.*, Paris, 1949.

HICKMANN (J. F.). — Comparative test of varieties of wheat. *Ohio. Agric. Exp. Sta.*, **2**, 121-132, 1889.

KLEINSCHMITT (A.). — Hydrolyse des Hordeins. *Ztschr. f. physiol. chem.*, **54**, 110-118, 1907.

LEONARD (M. J. K.) et BURRIS (R. H.). — A survey of transaminases in plants. *Journ. biol. chem.*, **170**, 701-709, 1947.

MASKELL (E. J.) et MASON (T. G.). — Studies on the transport of nitrogenous substances in the cotton plant. II. Observation on concentration gradients. *Ann. bot.*, **43**, 615-652, 1929.

MASKELL (E. J.) et MASON (T. G.). — Studies on the transport of nitrogenous substances in the cotton plant. V. Movement to the boll. *Ann. bot.*, **44**, 657-688, 1930.

MEÍSTER (A. L.). — Enzymatic transfer of α amino-group. *Science*, **120**, 43-50, 1954.

MEISTER (A. L.). — Transamination in amino-acid metabolism. *Feeder. Proc. U. S. A.*, **14**, 683-689, 1955.

MILLER (E. C.), GAUCH (H. G.) et GRIES (G. A.). — A study of the morphological nature and physiological functions of the Awns of winter wheats. *Kansas Agric. Exp. Sta.*, **57**, 1-83, 1944.

PARTRIDGE (S. M.) et WESTALL (R. G.). — Filter paper partition chromatography of sugars. 1-2. *Bioch. journ.*, **42**, 238-253, 1948.

PERCIVAL (J.). — The wheat plant. A monograph. London, Duckworth and Co ed., 1921.

PETIT (L.) et GUILLEMET (R.). — Comportement des mélasses de betteraves sur un échangeur de cations. *Ann. techno. I. N. R. A.*, **1**, 161-175. 1952.

PETRIE (A. H. K.) et WOOD (J. G.). — Studies in the nitrogen metabolism of plants. I. The relation between the content of proteins, amino acids and water in the leaves. *Ann. Bot. n. s.*, **2**, 33-60, 1938.

RAACKE (I. D.). — Protein synthesis in Ripening Pea seeds. III. Study of the Pods. *Bioch. Journ.*, **66**, 113-116, 1957.

SÄVENBORN (S.), DANIELSON (C. E.) et SVEDBERG (T.). — Svensk. Kem. Tidskr., **56**, 75, 1944.

SCHULZE (E. W.). — Comparative investigation on the transpiration of barbey with and without awns. *Mitt. Landw. Lehrkauz. K. K. Hochsh. Bod.*, Wien., **1**, 285-308, 1913.

SCRIBAN (R.). — Les protides de l'Orge, du Malt et du Moût. *Th. Doc. sc. nat.*, Lille, 1951.

STEWARD (F. C.), BIDWELL (R. G. S.) et YEMM (E. W.). — Protein metabolism, respiration and growth. A synthesis of results from the use of C^{14} labelled substrates and tissues cultures. *Nature*, Londres, **178**, 734-738.

THOMSON (J. F.), STEWARD (F. C.) et ZACHARIUS (R. M.). — Investigations on nitrogen compounds and nitrogen metabolism in plants. I. The reaction of nitrogen compounds with ninhydrin on paper a quantitative procedure. *Plant. Physiol.*, **26**, 375-397, 1951*a*.

THOMSON (J. F.) et STEWARD (F. C.). — Investigations on nitrogen compounds and nitrogen metabolism in plants. II. Variables in two directional paper chromatography of nitrogen compounds : a quantitative procedure. *Plant. Physiol.*, **26**, 421-440, 1951*b*.

VIRTANEN (A. I.). — Neue Amino-und Ketosäuren in grünen Pflanzen und die Biosynthese der Aminosäuren. *Angew. chem.*, **14-15**, 381-388, 1955.

WHITEHEAD (E. I.), VIETS (F. G.) et MOXON (A. L.). — Nitrogen distribution on the Corn plant. *Agric. Exp. Sta. S. Dakota*, **7**, 1-35, 1948.

WHITEHEAD (E. I.) et MOYER (F. L.). — Identification and estimation of amino-acids with accumulate in Corn plant fertilized with excess ammonium nitrogen. *Proc. S. Dakota. Acad. Sc.*, **28**, 74-75, 1949.

WHITEHEAD (E. I.), MOYER (F. L.) et MOXON (A. L.). — The effect of ammonium fertilization on the water soluble amino-acids of the Corn plant. 118e *Nat. Meeting of the Am. Chem. Soc.*, Chicago, 1950.

YEMM (E. W.) et FOLKES (B. F.). — The amino-acids of cytoplasmic and chloroplastic proteins of Barley. *Bioch. journ.*, **55**, 700-707, 1953.

ZOEBL (A.) et MIKOSCH (C.). — Die Function der Grannen der Gerstennähr. *Ann. Agr., Wien*, **21**, 143-144. *Math. Naturw., Wien*, **101**, 1033-1060, 1892.

Reçu pour publication le 20 Janvier 1959.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA NUTRITION AZOTÉE EN CULTURE SUR SABLE

PAR

D. BLANC [1]

Station d'Agronomie et de Physiologie végétale, Antibes.

DEUXIÈME MÉMOIRE

INCIDENCE DE LA TENEUR ET DE LA FORME D'AZOTE DANS LA SOLUTION NUTRITIVE SUR LE MÉTABOLISME AZOTÉ DU DACTYLIS GLOMERATA L.

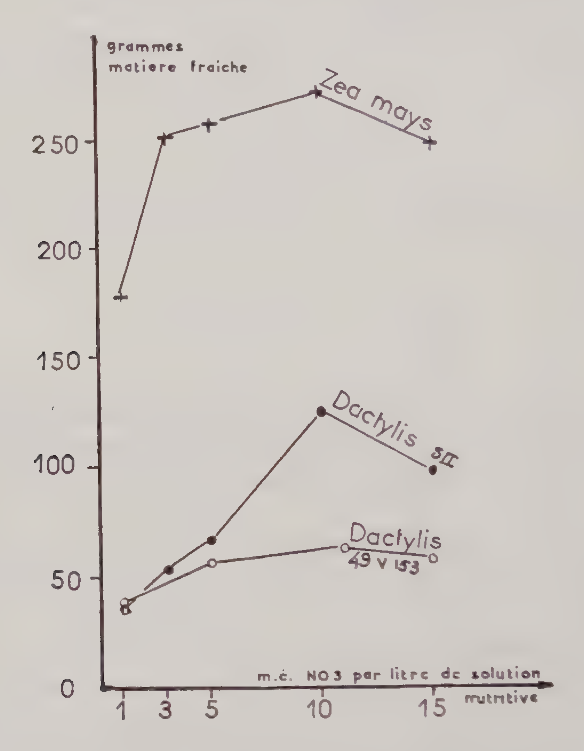
Nous avons étudié dans un précédent mémoire (1), l'influence de la concentration en azote nitrique et ammoniacal des solutions nutritives utilisées en culture sur sable, sur le développement du *Dactylis glomerata* L. et du *Zea mays* L.

Nous avons défini, pour chacune des espèces étudiées, une zone optimum de concentration en azote nitrique permettant d'obtenir, pour les conditions de concentration cationique et de milieu dans lesquelles nous avons travaillé, une production maximum de matière végétale. Nous avons d'autre part mis en évidence que l'introduction dans le milieu d'azote ammoniacal en quantité relativement faible détermine un accroissement de production de matière fraîche, dans la mesure où la nutrition nitrique est elle-même assurée. Ces résultats ont été obtenus avec des végétaux âgés de six semaines, c'est-à-dire dans leur phase de végétation active.

L'examen de la courbe de production totale de matière fraîche obtenue pour chacun des trois essais (graphique 1), nous permet de considérer que la gamme de solutions utilisée, s'étend depuis une concentration minimum en nitrates qui place l'azote au rang de facteur limitant, jusqu'à une concentration extrême, où, l'optimum étant dépassé, un autre facteur se comporte à son tour comme facteur limitant et détermine une

(1) Avec la collaboration technique de Mlle S. MARS.

diminution de rendement. Les formules de solutions nutritives utilisées et l'analyse cationique de la plante nous permettent d'affirmer que ce facteur limitant n'est pas un des éléments fournis par les solutions mais plus vraisemblablement un facteur climatique (température ou éclairement) qui peut varier avec les caractères génétiques de l'espèce étudiée.



Graphique 1.– Production de matière fraiche par Dactylis glomerata L. et Zea mays L. en fonction de la teneur en azote de la solution nutritive

L'étude de l'équilibre azoté du végétal et la connaissance des réserves hydrocarbonées mises par les parties aériennes à la disposition des racines, pour les différentes teneurs en azote des solutions nutritives utilisées, nous ont paru susceptibles de fournir un certain nombre de renseignements sur le métabolisme azoté de la plante, en fonction des productions de matières végétales obtenues.

Le présent mémoire rapporte les résultats analytiques fournis par le *Dactylis glomerata* L., souche II, soumis aux différents traitements constituant le deuxième essai sur Dactyle du précédent mémoire. Il fait

état également des modifications de l'équilibre azoté du végétal, consécutives à la substitution dans la solution nutritive, d'une partie de l'azote nitrique par de l'azote ammoniacal.

MATÉRIEL

Nous rappelons succinctement les conditions de l'essai : il comporte sept traitements (tableau I) caractérisés par des concentrations variables en azote. Chaque traitement comporte quatre répétitions. Les semis ont été effectués en mai et la récolte a eu lieu six semaines plus tard. Pendant la période de culture, la température moyenne s'est située aux environs de 25°C.

Tableau I

Traitements	I	II	III	IV	V	VI	VII
(N) en m. e. / litre sol. nutritrive	1	3	5	5	5	10	15
Formes NO_3	1	3	5	2	—	10	15
NH_4	—	—	—	3	5	—	—
Concentration totale de la solution en m. e./litre	10	10	10	11	13	15	19

Le pH des solutions a été ajusté à 6,5 et des contrôles fréquents sont effectués sur la solution effluente de façon à déceler une nitrification éventuelle des solutions ammoniacales. Le système de culture adopté pour cet essai et qui consiste en un apport intermittent de solution ne permet pas de se maintenir à l'abri d'une variation de pH dans le voisinage immédiat des racines et d'une légère acidification en milieu ammoniacal ; cependant le lessivage complet des pots de culture par les solutions nutritives apportées deux fois dans le courant de la journée, rétablit périodiquement le pH à sa valeur initiale et nous met à l'abri d'une acidification excessive du milieu.

DÉTERMINATIONS EFFECTUÉES

Nous avons dosé successivement sur les parties aériennes et les racines, après séchage à 75°C et broyage, l'azote sous ses différentes formes et les sucres (glucose et saccharose).

Azote.

La détermination des différentes formes d'azote (azote minéral, azote organique soluble et insoluble, et azote total) a nécessité une modification des méthodes classiques de dosages qui se trouvent en défaut dès l'instant où des quantités non négligeables de nitrates sont présentes dans le matériel analysé. Le mode opératoire indiqué ci-dessous, et ins-

piré de la méthode préconisée par « The JOINT A. B. O. M. — S. A. C. committee on methods for the analysis of trade effluents » (2) nous a donné d'excellents résultats et nous a permis d'établir des bilans avec des erreurs ne dépassant pas 3 p. 100.

Nous avons effectué trois groupes de déterminations :

— Détermination de l'azote soluble dans l'alcool à 50° qui représente l'azote minéral (nitrique et ammoniacal) et l'azote organique soluble.

— Détermination de l'azote insoluble sur le résidu de l'extrait alcoolique.

— Détermination de l'azote total sur la poudre végétale, cette dernière détermination servant essentiellement de contrôle aux déterminations antérieures.

Le mode opératoire est le suivant :

1. — Extraction et détermination de l'azote soluble.

L'extraction de l'azote soluble est effectuée sur 2 g de poudre végétale par 20 cc d'alcool éthylique à 50°. Le mélange est maintenu au bain marie à 80° C pendant 5 minutes, puis filtré et lavé à l'eau chaude. Après refroidissement, l'extrait est amené à 100 cc.

Azote ammoniacal. — Il est déterminé sur 25 cc de l'extrait, par distillation en présence de magnésie calcinée.

Azote nitrique. — Après distillation de l'azote ammoniacal, on ajoute au résidu dans le ballon de distillation, de l'alliage de Dewarda et on dose par distillation l'azote ammoniacal formé.

Azote organique. — Une autre fraction de 25 cc de l'extrait alcoolique est traitée dans un ballon d'attaque par 0,5 gramme de Dewarda et 0,3 cc de soude à 40 p. 100. On chauffe avec précaution pour éliminer la totalité de l'azote minéral. L'ébullition est maintenue jusqu'à ce qu'il ne reste plus que 10 cc environ de liquide dans le ballon. Le résidu est refroidi et additionné de 10 cc de SO_4H_2 concentré. On porte à l'ébullition et on poursuit l'attaque 10 minutes après décoloration. On neutralise par la soude, et après 4 minutes, addition d'un léger excès de soude, on distille l'azote ammoniacal formé.

2. — Détermination de l'azote insoluble.

Il est déterminé sur une partie aliquote du résidu de l'extraction alcoolique par une attaque Kjeldahl en présence de SO_4H_2, suivi du dosage par distillation de l'azote ammoniacal formé.

3. — Détermination de l'azote total.

Elle est effectuée sur la poudre végétale avec élimination préalable de l'azote minéral, selon le processus suivant : 250 mg de poudre sont

additionnés dans un matras de 20 cc d'alcool éthylique à 50°, et maintenus 5 minutes au bain marie à 80°C. On introduit dans le matras 0,5 g de Dewarda et 0,3 cc de NaOH à 40 p. 100, et on chauffe avec précaution. L'ébullition est maintenue jusqu'à une concentration de 10 cc environ. On refroidit alors le matras, on ajoute 10 cc de SO_4H_2 concentré. Le mélange est porté à l'ébullition et l'attaque est maintenue 10 minutes après décoloration.

On neutralise par un excès de soude et on distille l'azote ammoniacal formé.

On ajoute au résultat obtenu la quantité totale d'azote ammoniacal et nitrique dosée par ailleurs.

La comparaison des colonnes 7 (bilan effectué par addition des différentes fractions dosées) et 8 (azote total déterminé sur la poudre) du tableau II, permet d'apprécier la valeur de la méthode.

Sucres.

Ils sont déterminés sur une partie aliquote de l'extrait alcoolique suivant la méthode préconisée par J. Carles (3). Nous préférons, à la défécation par l'acétate neutre de plomb, le passage de l'extrait sur résines à cations puis sur résines à anions (Amberlite IR 120 sous forme H^+, et Dowex 3 sous forme OH^-).

RÉSULTATS

Ils sont groupés dans les tableaux II et III.

Tableau II

Composition azotée et glucidique des parties aériennes de Dactylis glomerata L. *en fonction de la composition azotée du milieu nutritif.*

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Traitements	Azote minéral		Azote organique		Azote total		Sucres	
Nos		ammoniacal %	nitrique %	soluble %	insoluble %	calculé (1) %	dosé %	glucose %	saccharose %
I	1 NO_3	0,019	0,01	0,13	1,70	1,86	1,92	1,19	1,19
II	3 NO_3	0,017	0,02	0,40	1,95	2,39	2,48	0,90	1,03
III	5 NO_3	0,020	0,29	0,36	2,40	3,07	3,17	0,86	1,16
IV	2 NO_3 + 3 NH_4	0,027	0,04	0,51	2,52	3,10	3,17	0,81	0,48
V	5 NH_4	0,029	0,02	0,51	2,42	2,98	3,09	0,91	0,98
VI	10 NO_3	0,023	1,28	0,45	2,46	4,21	4,31	0,75	1,77
VII	15 NO_3	0,035	2,15	0,46	2,33	4,98	5,01	0,73	1,26
p. p.	P = 0,05	0,004	0,25	—	0,26	—	0,26	0,11	0,24
d. s.	P = 0,01	0,005	0,34	0,05	0,24	—	0,34	0,16	0,33

(1) Somme des différentes formes azotées reportées dans les colonnes 3, 4, 5 et 6.

TABLEAU III

Composition azotée et glucidique des racines de Dactylis glomerata L. *en fonction de la composition azotée du milieu nutritif.*

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Traitements		Azote minéral		Azote organique		Azote total		Sucres	
		ammoniacal %	nitrique %	soluble %	insoluble %	calculé [1] %	dosé %	glucose %	saccharose %
I	1 NO_3	0,008	0,004	0,20	0,76	0,97	0,98	0,62	1,24
II	3 NO_3	0,009	0,008	0,21	0,87	1,10	1,13	0,59	1,25
III	5 NO_3	0,010	0,047	0,26	1,02	1,34	1,38	0,34	1,18
IV	2 NO_3 + 3 NH_4	0,024	0,010	0,30	1,12	1,45	1,50	0,21	0,82
V	5 NH_4	0,028	0,021	0,46	1,31	1,82	1,80	0,57	3,41
VI	10 NO_3	0,023	0,18	0,20	1,22	1,62	1,74	0,10	1,09
VII	15 NO_3	0,023	0,20	0,34	1,36	1,92	1,97	0,20	1,69
p. p.	P = 0,05	0,004	0,015	0,04	0,07	—	0,05	0,10	0,21
ds	P = 0,01	0,006	0,020	0,05	0,10	—	0,07	0,13	0,29

(1) Somme des différentes formes azotées reportées dans les colonnes 3, 4, 5 et 6.

A. — NUTRITION NITRIQUE

Nous avons représenté sur les graphiques 2, 3 et 4, les variations relatives de l'azote total, l'azote organique soluble et l'azote organique insoluble dans les parties aériennes et les racines de *Dactylis glomerata L.* quand la teneur en nitrates de la solution nutritive augmente. Le graphique 5 représente les variations absolues de l'azote nitrique. L'azote ammoniacal n'est présent qu'en très faibles quantités et ses variations par rapport à celles de l'azote nitrique sont négligeables.

L'examen de ces graphiques met en évidence les faits suivants :

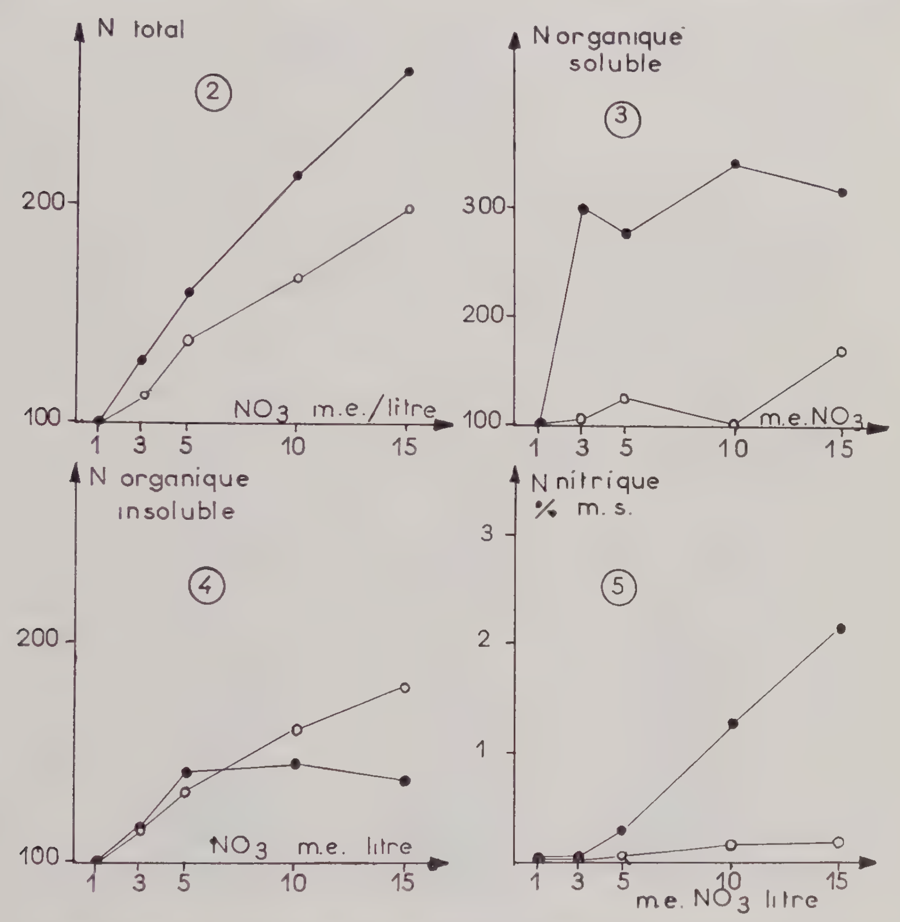
1. — D'une façon générale les parties aériennes réagissent plus fortement que les racines, aux variations de la teneur en nitrates du milieu.

2. — Une augmentation de la concentration en azote nitrique de la solution nutritive détermine un accroissement significatif de la teneur en azote total de l'ensemble du végétal.

3. — L'azote nitrique apparaît dans la plante pour une concentration en nitrates de la solution supérieure à 3 m. e. par litre. L'accumulation des nitrates est particulièrement importante dans les parties aériennes.

4. — L'azote organique soluble dans les racines se maintient à un taux relativement constant et indépendant de la teneur en nitrates du milieu, sauf pour la plus forte concentration de 15 m. e. de N nitrique par litre ; pour cette concentration, on observe une augmentation signi-

ficative de la teneur en azote organique soluble. Dans les parties aériennes, pour les faibles concentrations, une augmentation en azote nitrique dans le milieu, détermine une forte augmentation de l'azote organique soluble.



Graphiques 2, 3 et 4. — Variations indiciaires des différentes formes d'azote en fonction de la teneur en nitrates du milieu

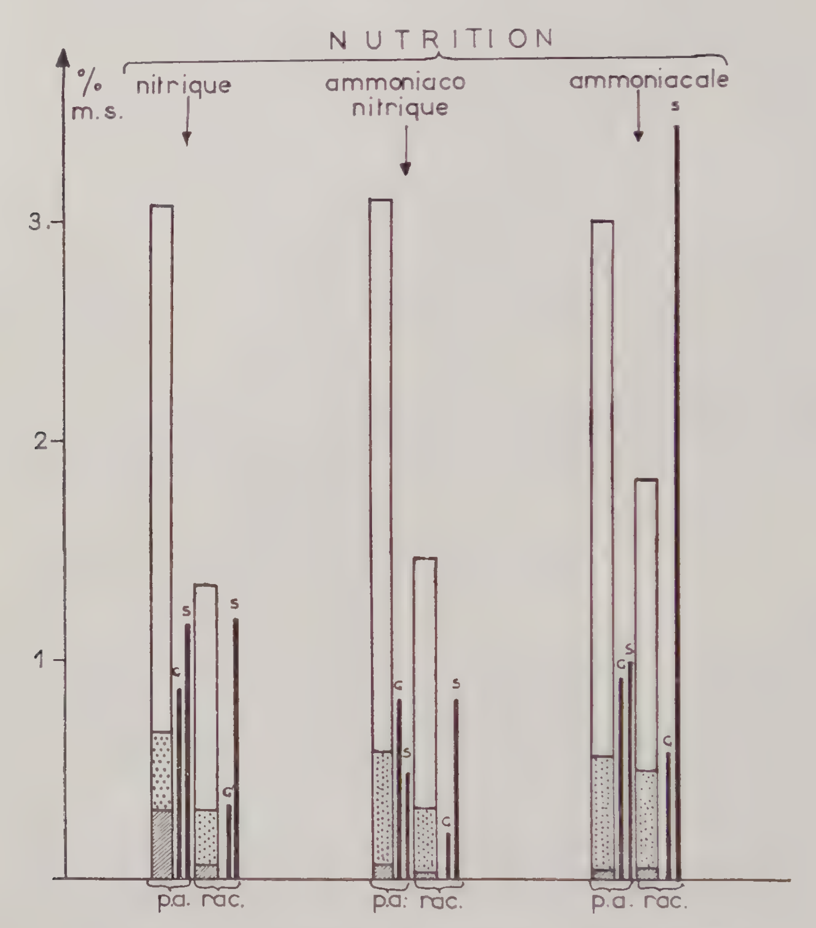
Graphique 5. — Variations de la teneur en azote nitrique en fonction de la teneur en nitrates des solutions nutritives

Légende { •——• parties aériennes ; o——o racines }

A partir de 3 m. e. d'azote nitrique dans le milieu, les variations sont beaucoup plus faibles et pratiquement indépendantes de la concentration de la solution nutritive.

5. — L'azote insoluble augmente très régulièrement et de façon significative dans les racines, avec la teneur en azote du milieu. Dans les

parties aériennes, il augmente très rapidement pour les faibles concentrations puis se maintient à peu près constant à partir de 5 m. e. de nitrates par litre de solution nutritive.



Graphique 6. — Influence de la forme d'azote sur l'équilibre biochimique de Dactylis glomerata L.

Le dosage des sucres met en évidence une légère diminution des sucres dans les parties aériennes avec une augmentation en nitrates dans le milieu. La teneur en saccharose des parties aériennes est indépendante de la fourniture d'azote.

Dans les racines, au maximum de production (obtenu pour 10 m. e. de nitrates par litre) correspond la teneur minimum en glucose. Celui-

ci diminue avec une augmentation des nitrates dans le milieu. Le saccharose se maintient constant jusqu'à la dose de 5 m. e. de nitrates par litre de solution, puis augmente avec la teneur en nitrates.

B. — NUTRITION AMMONIACO-NITRIQUE

Dans le présent essai la comparaison du métabolisme azoté du Dactyle en milieu nitrique, ammoniaco-nitrique et ammoniacal, n'a été faite qu'à une concentration moyenne de 5 m. e. d'azote total par litre de solution nutritive. Pour cette concentration, la substitution d'une partie ou de la totalité de l'azote nitrique par de l'azote ammoniacal détermine des modifications de l'équilibre azoté de la plante qui sont représentées sur le graphique 6.

La substitution de l'azote ammoniacal à l'azote nitrique se traduit essentiellement :

1° Au niveau des parties aériennes, par une augmentation de l'azote organique soluble aux dépens de l'azote minéral, sans changement significatif de la teneur en azote total. En milieu ammoniaco-nitrique, on observe un maximum de teneur en azote protéique.

2° Au niveau des racines, par une augmentation significative de la teneur en azote total, cette augmentation étant également répartie entre l'azote organique soluble et insoluble.

La présence d'ions ammonium dans le milieu nutritif détermine une augmentation significative de la teneur en ammonium de la plante, sans que l'on observe d'accumulation, même en milieu exclusivement ammoniacal.

Le dosage des sucres fait apparaître une diminution importante du glucose et du saccharose en milieu ammoniaco-nitrique. En milieu exclusivement ammoniacal, on observe une accumulation de saccharose dans les racines.

DISCUSSION

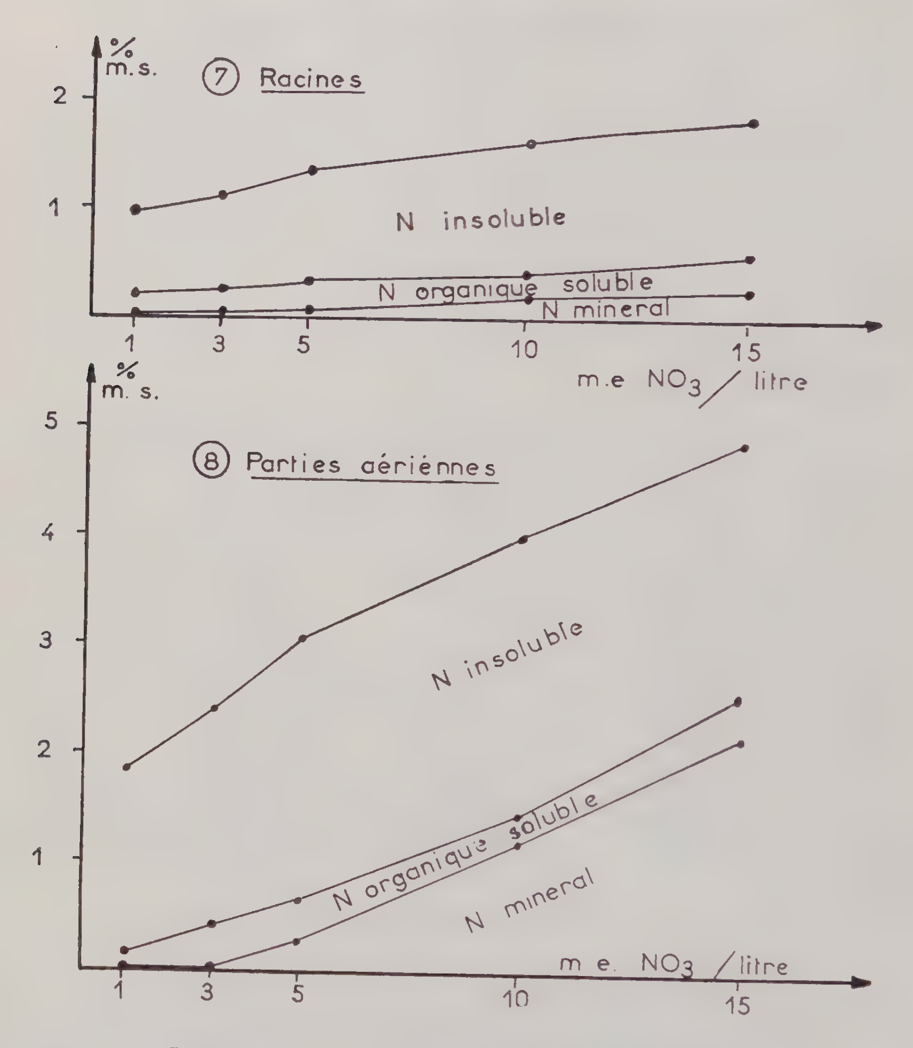
Absorption et métabolisme des ions NO_3 par Dactylis glomerata L.

La détermination des principaux groupes de constituants azotés des parties aériennes et racines de Dactyle met en évidence des états d'équilibre différents selon la fourniture d'azote mise à la disposition de la plante. Les variations des différentes formes d'azote sont groupées sur les graphiques 7 et 8.

Pour expliquer les différents équilibres observés dans les conditions de notre essai, il est indispensable de rappeler succinctement l'état actuel de nos connaissances sur la réduction des nitrates dans la plante.

Le passage de la forme nitrique à la forme ammoniacale avec pro-

duction de composés azotés intermédiaires, non encore déterminés de façon absolue, s'effectue par une série de réactions d'oxydo-réduction faisant passer l'azote de la valence + 5, dans la forme nitrique à la va-



GRAPHIQUES 7 et 8. — Variations des différentes formes d'azote dans les racines et les parties aériennes de Dactylis glomerata L.

lence — 3 dans la forme ammoniacale. Il a été mis en évidence que, chez les végétaux supérieurs, la source d'électrons nécessaires à une telle réaction sont les pyridines nucléotides réduites engendrées par les réactions oxydatives de la respiration et également dans la photolyse de l'eau au niveau des chloroplastes. Chacune des réactions de réduction s'effectue

grâce à des enzymes identifiées comme étant des métalloflavoprotéines. Les ions NH_4^+ produits au cours de la réduction des nitrates s'unissent enfin à des acides dicarboxyliques (fumarique, oxaloacétique et cétoglutarique) qui sont des rétenteurs spécifiques de l'ammoniaque et qui sont produits au cours de la phase glycolytique de la respiration.

Il résulte de l'ensemble de ces faits, que le pouvoir réducteur du végétal dépend, à côté de facteurs internes de caractère génétique, de facteurs externes tels que la composition du milieu nutritif, la température ou la lumière.

Le caractère enzymatique des processus de réduction et la nature même des enzymes intervenant dans les différentes réactions d'oxydo-réduction, confèrent aux éléments minéraux et plus particulièrement aux oligo-éléments une importance de premier ordre dans le métabolisme de l'azote. Qu'ils jouent le rôle d'inhibiteurs comme le cuivre, ou d'activateurs comme le zinc, le manganèse ou le soufre, un mauvais équilibre en éléments mineurs, se traduit toujours dans la plante par une modification du métabolisme azoté et en général par une accumulation de nitrates. Parmi eux une place toute spéciale revient au molybdène, seul élément pour lequel un besoin réel ait été démontré, puisqu'il entre précisément dans la constitution d'une réductase des nitrates isolée des racines et des parties aériennes d'un certain nombre de végétaux supérieurs.

Les liens étroits qui unissent le métabolisme de l'azote à la dégradation des sucres, placent les processus de réduction des nitrates sous la dépendance directe de tout facteur susceptible d'agir sur la synthèse glucidique et sur les phénomènes respiratoires. Deux facteurs sont particulièrement importants à ce point de vue : le facteur lumière d'une part, qui permet à la plante de reconstituer son stock glucidique épuisé au cours des échanges respiratoires et indispensable à la fourniture d'acides dicarboxyliques pour la synthèse des acides aminés, et le facteur aération qui, en modifiant le potentiel d'oxydo-réduction du milieu, peut accélérer ou limiter la réduction des nitrates : il a été en effet, mis en évidence que la réduction des nitrates est plus importante sous une faible tension d'oxygène dans le milieu, phénomène qui peut s'expliquer par une compétition entre l'oxygène et les ions NO_3^-, comme accepteurs des pyridines nucléotides réduites.

A ces facteurs externes, il convient d'ajouter le facteur génétique qui détermine un comportement spécifique du végétal : certaines espèces peuvent accumuler des quantités importantes de nitrates qu'elles ne sont pas en mesure de réduire : d'autres ont, par contre, un pouvoir réducteur fort élevé et réduisent la totalité des nitrates qui sont mis à leur disposition. On a tendance actuellement à considérer que la localisation de la réduction varie également avec les espèces : le siège de la réduction des nitrates dans la plante est assez mal défini. On a considéré pendant long-

temps que cette réduction s'effectuait uniquement au niveau des racines. La présence de quantités parfois importantes de nitrates dans les feuilles de certains végétaux et l'isolement d'une réductase des nitrates dans ces mêmes organes permettent d'envisager leur réduction éventuelle dans les parties aériennes.

Ces diverses observations sur le rôle des hydrates de carbone dans la réduction des nitrates et sur la localisation de la réduction vont nous permettre d'interpréter les divers équilibres que nous avons obtenus dans les différentes parties de la plante avec des doses croissantes d'azote dans le milieu nutritif, et de tirer quelques conclusions sur le comportement spécifique du *Dactylis glomerata* L.

L'examen des graphiques 7 et 8 met en évidence que dans les parties aériennes, et à un degré moindre, dans les racines, les variations de teneurs en azote total sont étroitement liées aux variations de teneurs en nitrates des solutions nutritives. L'absorption des nitrates par le Dactyle, dépend donc directement de la fourniture du milieu en cet élément sur toute la gamme de concentrations étudiée, mais l'absorption n'implique pas l'assimilation ; l'utilisation des ions NO_3 pour la synthèse de composés organiques dépend de l'équilibre biochimique du végétal.

L'étendue de la gamme de solutions expérimentées nous permet de délimiter, dans les conditions de notre essai, trois zones de concentration en nitrates telles qu'à l'intérieur de chacune d'elles, une variation de la fourniture en azote s'accompagne d'une modification bien déterminée de l'équilibre azoté de la plante. Jusqu'à la concentration de 3 m. e. d'azote nitrique par litre de solution nutritive, l'absorption des nitrates par la plante est inférieure à ses besoins et à ses possibilités d'assimilation. Dans cette zone de carence, caractérisée par une richesse excessive des racines en glucides, la plante réduit dès leur absorption la totalité des ions nitriques que lui fournit le milieu ; les ions NH_4 formés trouvent au niveau des racines les acides dicarboxyliques nécessaires à la synthèse des acides aminés : ces deux faits expliquent l'absence presque totale d'azote minéral dans la plante et l'augmentation rapide de la teneur en azote organique soluble : c'est sous cette forme que les parties aériennes reçoivent l'azote nécessaire à la protéogenèse. Pour ces faibles concentrations une augmentation de la teneur en nitrates du milieu se manifeste dans la plante par un accroissement de la teneur en azote organique. De 3 à 5 m. e. d'azote nitrique par litre de solution nutritive, le taux d'absorption est supérieur au potentiel de réduction des racines, une partie seulement des ions absorbés peuvent être réduits à ce niveau, des ions nitriques transportés par le flot de sève ascendante commencent à apparaître dans les parties aériennes. L'augmentation importante de l'azote organique dans ces organes laisse supposer qu'une partie des ions nitriques absorbés et transportés dans les feuilles sont réduits et utilisés sur place à la syn-

thèse de composés azotés organiques. L'augmentation de l'azote total est dans cette zone, le résultat d'une synthèse accrue de composés azotés insolubles et d'un début d'accumulation d'azote nitrique non assimilé.

Pour des concentrations supérieures à 5 m. e. de nitrates par litre de solution, on observe une accumulation encore plus importante d'azote nitrique sans augmentation de l'azote organique. Dans cette zone l'augmentation de l'azote total au niveau des parties aériennes correspond très exactement à l'augmentation de teneur en azote nitrique qui représente jusqu'à 47 p. 100 de l'azote total. Cette accumulation de nitrates dans la plante ne s'accompagne pas d'une accumulation d'ions NH_4^+ : l'ammonium ne se rencontre qu'à de très faibles concentrations dans le Dactyle cultivé sur milieu nitrique. L'azote ammoniacal provenant de la réduction des nitrates est donc immédiatement transformé en azote organique et c'est la phase de réduction même des ions NO_3 qui est bloquée dès que leur absorption dépasse le taux d'assimilation maximum. Nous avons vu que ce taux d'assimilation dépend d'un certain nombre de facteurs externes et internes.

Dans les conditions de la présente expérimentation, la composition en oligo-éléments des solutions nutritives utilisées, des essais avec apport complémentaire de molybdène et l'analyse minérale des produits récoltés nous permettent d'écarter l'éventualité d'une accumulation de nitrates consécutive à un déséquilibre minéral.

La diminution importante de la teneur en glucose des racines avec l'augmentation du taux de nitrates absorbés, permet de mettre en cause un métabolisme glucidique insuffisant pour une réduction plus importante des nitrates dans ces organes. Ce même facteur ne semble pas intervenir au niveau des parties aériennes où l'accumulation des nitrates s'effectue en présence de quantités encore importantes de sucres.

Le pouvoir réducteur limité des parties aériennes du Dactyle pourrait alors s'expliquer par une tension trop élevée d'oxygène au niveau de ces organes, à moins que le facteur limitant ne soit de caractère purement génétique. Des essais complémentaires s'avèrent indispensables pour déceler les causes de cette accumulation excessive de nitrates non métabolisés.

Toutefois la non assimilation des ions NO_3 ne peut être considérée comme l'indice d'une consommation de luxe tant qu'une augmentation d'azote dans la solution nutritive détermine une augmentation de rendement, ce qui est le cas dans notre essai jusqu'à la concentration de 10 m. e. de NO_3 par litre de solution nutritive. Cependant, au-delà de cette concentration, et pour des teneurs de l'ordre de 15 m. e. par litre de solution nutritive, la teneur en protéines exprimée par rapport à la matière sèche, n'augmente pas dans la plante. De plus la production de matière fraîche est moindre, et en valeur absolue la protéogenèse diminue ; les

nitrates continuent à s'accumuler dans le végétal. Pour ces concentrations et dans les conditions de notre essai, nous sommes en présence d'une consommation de luxe. Un autre facteur extérieur intervient à son tour, qui limite l'utilisation de l'azote, ralentit le développement de la plante et joue le rôle de facteur limitant.

Équilibre azoté du Dactylis glomerata L. en milieu ammoniaco-nitrique.

L'augmentation de rendement qui résulte du remplacement d'une partie de l'azote nitrique par de l'azote ammoniacal, s'accompagne comme nous l'avons déjà signalé, d'une modification sensible de l'équilibre azoté de la plante. Ces modifications résultent de la différence dans la nature des ions mis en jeu. Indépendamment des processus d'absorption qui s'effectuent selon deux voies distinctes (voie d'absorption des cations pour l'ion NH_4^+, et voie d'absorption des anions pour l'ion NO_3^-), l'assimilation elle-même de ces deux formes d'azote diffère par le fait, qu'en milieu nitrique, la plante doit réduire les ions NO_3 en ions NH_4, avant leur assimilation.

La présence dans le milieu nutritif d'un pourcentage élevé d'azote sous forme ammoniacale n'entraîne pas l'apparition d'une quantité importante d'ions NH_4 dans la plante : les ions NH_4 sont donc unis à des acides dicarboxyliques dès leur absorption : il en résulte une augmentation sensible de l'azote organique soluble dans les racines des plantes cultivées sur milieu ammoniaco-nitrique. Or, à concentration égale en azote, la nutrition nitrique détermine une absorption d'ions NO_3 supérieure aux possibilités de réduction des nitrates dans les racines ; la substitution d'ions NH_4 à des ions NO_3 dans le milieu, apporte à la plante des ions déjà réduits et immédiatement assimilables, il en résulte une assimilation plus rapide et plus complète de l'azote minéral absorbé, qui peut expliquer l'augmentation de rendement observée. Il est bien évident qu'une telle interprétation n'est valable que dans la mesure où la présence d'ions NH_4 à côté d'ions nitriques détermine une augmentation de rendement par rapport à la nutrition exclusivement nitrique, c'est-à-dire pour des concentrations en ions NH_4 telles que les troubles du métabolisme liés à l'absorption d'ions ammoniacaux et attribués à un déséquilibre de la balance acido-basique de la plante, ne se manifestent pas encore.

CONCLUSIONS

La relation directe qui lie la teneur en azote total de la plante à la fourniture d'azote par le milieu nutritif met en évidence l'influence prépondérante de la concentration en azote nitrique du milieu sur l'absorption des ions NO_3 par le Dactyle. Par ailleurs la détermination des diffé-

rentes formes d'azote dans le végétal fait ressortir la constance relative des formes organiques solubles et insolubles malgré des taux d'azote très variables dans les solutions nutritives : cette constance dans la composition organique azotée de la plante normalement alimentée en azote révèle un mécanisme régulateur de la réduction des nitrates qui détermine, aux plus fortes concentrations, des accumulations importantes de nitrates non assimilés, accumulations qui, chez le Dactyle, sont localisées au niveau des parties aériennes.

La concentration en azote nitrique déterminant, dans les conditions de notre expérience, un maximum de production de matière végétale, ne correspond pas à un équilibre azoté particulier de la plante. La confrontation des productions de matière végétale obtenues en cours de culture et des équilibres azotés du matériel récolté est indispensable pour déterminer la concentration en nitrates permettant un maximum de protéogénèse dans les conditions de l'expérience et par suite un maximum d'utilisation des nitrates disponibles dans le milieu de culture.

Les concentrations auxquelles nous avons travaillé correspondent à des teneurs en azote nitrique normales dans les sols cultivés (de 14 à 210 kg d'azote minéral à l'hectare). L'éventualité des faits que nous avons observés en culture sur sable est par conséquent tout à fait plausible en culture en pleine terre ; cependant un certain nombre de facteurs faisant partie intégrante du sol et pouvant intervenir dans les processus d'assimilation des nitrates dans la plante sont éliminés en culture sur sable : nous citerons à titre d'exemple l'acide humique présent dans les sols et dont nous avons signalé l'influence dans le métabolisme azoté de la plante (4).

RÉSUMÉ

La détermination des formes d'azote dans les racines et les parties aériennes de *Dactylis glomerata* alimenté par des solutions nutritives de teneur croissante en azote nitrique permet de faire quelques observations sur le métabolisme azoté de cette espèce.

L'absorption des nitrates par le Dactyle dépend de la concentration des solutions nutritives en cet élément. Sauf aux très faibles concentrations, la réduction des nitrates est indépendante du taux d'absorption et dépend de l'équilibre biochimique du végétal.

Dans les conditions de l'expérience le Dactyle présente un pouvoir réducteur limité et, pour des teneurs en nitrates des solutions nutritives correspondant à des doses d'azote minéral normales dans les sols cultivés, on observe une accumulation importante de nitrates dans les parties aériennes. La substitution d'azote ammoniacal à une partie de l'azote nitrique détermine une augmentation de rendement, qui peut s'expliquer par l'absorption d'une partie de l'azote sous une forme déjà réduite, immédiatement utilisable pour la synthèse de composés organiques azotés.

Reçu pour publication le 13 Mars 1959.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) BLANC (D.). — Contribution à l'étude de la nutrition azotée en culture sur sable (1er mémoire). *Ann. Agro.* (Phys. Vég.), 1958, *suppl. I*, pp. 49-69.

(2) Recommended methods for the analysis of Trade Effluents Method for the determination of Combined nitrogen. *The Analyst*, 1957, **82**, pp. 276-284.

(3) CARLES (J.). — Microdosage des oses. *Bul. Soc. Biol.*, 1953, XXXV, pp. 365-367.

(4) BLANC (D.). — Influence de l'extrait humique sur le métabolisme azoté du végétal. Comptes rendus de l'Académie des Sciences, 247, 1958, p. 1649.

LES ACIDES ORGANIQUES DES PLANTES FOURRAGÈRES

II. — VARIATIONS AVEC LE STADE DE DÉVELOPPEMENT CHEZ LE DACTYLE ET LA FÉTUQUE DES PRÉS

PAR

G. FAUCONNEAU [1]

Service de Biochimie et de Nutrition, C. N. R. Z., Jouy-en-Josas (S & O).

INTRODUCTION

Dans nos travaux antérieurs (FAUCONNEAU et JARRIGE (1954) et FAUCONNEAU (1958)), nous avons montré que les acides organiques totaux constituaient une fraction appréciable de la matière sèche des graminées (2,3-7 p. 100) ; en outre leur concentration dans la plante diminue régulièrement avec l'âge (comme les matières azotées totales), par suite de la diminution du rapport feuilles/tiges et des différences de concentration dans ces deux organes. Les acides organiques identifiés et dosés dans le ray-grass anglais (n'ayant pas reçu de fumure azotée), étaient l'acide malique, l'acide citrique, l'acide quinique et l'acide shikimique ; nous n'avions mis en évidence ni l'acide succinique, ni l'acide malonique (particulièrement abondant chez les légumineuses) ; nos résultats étaient en accord avec certains travaux antérieurs (BENTLEY 1952), mais en désaccord avec DAVIES et HUGUES (1954), qui avaient identifié de l'acide succinique chez les graminées.

MATÉRIEL ÉTUDIÉ

Nous avons poursuivi nos recherches sur les plantes fourragères par l'étude analytique au cours du premier cycle de développement d'un dactyle demi-précoce S 143 et d'une fétuque des prés S 215 semés au

(1) Avec la collaboration technique de Melle M. FORIGNON.

printemps 1956, ayant reçu une forte fumure azotée au printemps 1957 (40 unités pour la fétuque et 80 unités pour le dactyle). Les croissances ont été rapides et les plantes ont eu un développement important.

Le tableau I résume les caractéristiques du matériel étudié lors des différents prélèvements échelonnés au cours de la croissance. Les échantillons ont été coupés au milieu de la journée (11 h 30-14 h 30), par beau temps, congelés rapidement à —15°, et lyophylisés. Les différentes parties ont été séparées quantitativement (limbes, gaines, tiges et inflorescences), broyées finement et analysées séparément. Les proportions des différents organes sont indiquées dans le tableau I : la proportion des gaines diminue lentement et est voisine chez les deux espèces étudiées (33,7-20,1 chez le dactyle contre 32,3-25,2 chez la fétuque) ; la proportion des limbes diminue beaucoup plus rapidement en particulier chez la fétuque (67,7-8,8 contre 66,7-21,8 chez le dactyle) ; la proportion des tiges augmente régulièrement avec l'âge (après l'épiaison), et est d'autant plus importante que les limbes sont moins abondants (fétuque) ; les inflorescences constituent une fraction appréciable des plantes en fleurs (18,2-15,9).

Tableau I

Caractères botaniques de matériel étudié.
(Étude du premier cycle de développement).

	Date de prélèvement	Hauteur cm	Proportions des différents organes (% de la matière sèche totale)				Matière sèche de la plante entière	Stade de développement
			Limbes	Gaines	Tiges	Inflorescences		
Dactyles	9 Avril	15-20 cm	66,7	33,7			16,43 %	feuillu
Jouy-en-Josas	27 Avril	35-45	66,8	31,7	1,53		17,03	feuillu
1957	20 Mai	60	41,7	28,9	24,1	5,17	17,48	épiaison
Fumure azotée	9 Juin	100-110	21,8	20,1	40,0	18,2	27,87	début floraison
80 unités								
Fétuques	9 Avril	15-20	67,7	32,3			18,0 %	feuillu
Jouy-en-Josas	27 Avril	30-40	54,6	37,6	7,8		22,94	feuillu
1957	20 Mai	60	23,8	35,5	33,4	7,2	22,78	épiaison
Fumure azotée	9 Juin	90	8,8	25,2	50	15,9	31,48	floraison
40 unités								

MÉTHODES UTILISÉES

Nous avons adjoint à la méthode déjà employée par nous (FAUCONNEAU 1958) un contrôle systématique des fractionnements et des traitements nécessaires à la purification des extraits : nous surchargeons systématiquement les extraits, dès leur obtention, par de l'acide tartrique ; ce dernier n'apparaît jamais dans nos extraits de plantes fourragères, et son ordre de sortie sur la colonne de Dowex 1 (formate) se situe entre l'acide malique et l'acide citrique. Nous avons montré que

tous les acides analysés (quinique, malique, tartrique et citrique) ont un recouvrement voisin de 85 p. 100 au cours d'un même fractionnement (à plus ou moins 5 p. 100 près) ; nous avons systématiquement corrigé nos résultats (acides organiques totaux) par le facteur de recouvrement de l'acide tartrique trouvé lors de chaque fractionnement. Les pertes consécutives à l'évaporation de l'acide formique dans les fractions provenant des colonnes de Dowex 1, ont été contrôlées systématiquement par l'évaporation dans des conditions analogues (sous vide à température inférieure à 40°) de standards d'acide malique : ces pertes sont toujours inférieures à 3 p. 100.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les acides isolés au cours du fractionnement sur Dowex 1 des extraits de fétuque et de dactyle, sont les mêmes que ceux trouvés dans le ray-grass ; acide quinique, acide shikimique, acide malique et acide citrique ; cependant nous avons trouvé en sus, un peu d'acide succinique dans les limbes de dactyle jeune (cet acide a été identifié par chromatographie sur papier dans 3 solvants indépendants (FAUCONNEAU 1958) ; DAVIES et HUGUES 1954 et HULME 1954 avaient identifié de l'acide succinique dans un mélange de graminées. Le pic de l'acide quinique est constitué d'un mélange en proportions variables d'acide quinique et d'acide shikimique (déjà identifié chez le ray-grass). Enfin le dactyle contient des traces d'acide malonique (mélangé à l'acide citrique). Nous n'avions jusqu'alors identifié cet acide que dans les légumineuses qui en sont particulièrement riches (15-40 p. 100 des acides organiques totaux de la luzerne).

Influence du stade de développement.

A. Composition des différents organes.

ACIDES ORGANIQUES TOTAUX

Dactyle — tableau IV — Les acides organiques totaux de chacun des organes varient relativement peu avec l'âge des plantes, mais leur concentration présente de grandes différences suivant les diverses parties : 27-32,5 mg/g dans les limbes contre 14,5-16,8 dans les gaines et 13-16,7 dans les tiges, les fleurs sont particulièrement pauvres (9,5 mg/g).

Fétuque — tableau V — Les diverses parties de la fétuque présentent les mêmes caractéristiques : différences entre organes et constance avec les différents stades, des acides organiques totaux de chacune des parties ; les limbes sont plus riches que ceux des dactyles : 38,3-45,3 contre 27,5-33,5 mg/g).

Acides organiques individuels

Dactyle — tableaux II et IV — Dans les limbes la quantité absolue d'acide citrique diminue, cependant que celle de l'acide malique augmente ; les proportions suivent la même loi puisque les acides organiques totaux varient peu. Dans les gaines l'augmentation de l'acide malique se fait faiblement aux dépens de l'acide quinique et fortement aux dépens de l'acide citrique ; les proportions des acides dans les différents organes (tableau IV) montrent que les gaines ont une composition intermédiaire entre les limbes et les tiges ; les gaines jeunes ont une composition voisine de celle des limbes, cependant que les gaines âgées ont des proportions d'acides organiques analogues à celles des tiges (abondance de l'acide malique). Dans les tiges l'augmentation des proportions de l'acide malique a lieu seulement aux dépens de l'acide quinique. Les fleurs se caractérisent par leur richesse en acide citrique (les proportions sont voisines de celles des limbes jeunes).

Tableau II

Influence du stade de développement sur la composition des différents organes d'un dactyle (1957). (p. 1000 de la matière sèche).

Organes	Dates de prélèvement	Azote total	Acides organiques			
			Quinique	Malique	Citrique	Succinique
Limbes	3 Avril	40,0	7,7	14,70	3,8	1,2
	27 Avril	32,50	8,2	20,7	2,9	0,9
	20 Mai	27,05	7,2	18,7	2,8	
	8 Juin	23,8	9,0	22,7	1,7	
Gaines	9 Avril	24,85	non dosé	non dosé	non dosé	
	27 Avril	19,46	5,1	9,7	1,95	
	20 Mai	10,6	4,1	8,6	1,8	
	8 Juin	7,70	2,15	11,9	1,2	
Tiges	20 Mai	10,2	3,2	12,2	1,3	
	8 Juin	5,4	1,90	10,2	0,9	
Inflorescences	8 Juin		2,5	5,60	1,4	
Plante entière	9 Avril		6,8	12,9	3,2	0,8
	27 Avril		7,1	16,9	2,5	0,6
	20 Mai		5,7	13,5	2,1	
	8 Juin		3,6	12,4	1,2	

(1) Tous les chiffres de ce tableau sont la moyenne des résultats obtenus au cours de 2 ou 3 fractionnements indépendants sur Dowex 1.

Fétuque — tableaux III et V — Les variations systématiques avec l'âge sont plus faibles et différentes de celles trouvées chez le dactyle : tant les proportions que les quantités absolues de l'acide malique varient

TABLEAU III

Influence du stade de développement sur la composition des différents organes d'une fétuque (1957). (p. 1000 de la matière sèche).

Organes	Dates de prélèvement	Azote total	Acides organiques			
			Quinique	Malique	Citrique	Succinique
Limbes	9 Avril	31,1	10,7	29,4	5,1	
	27 Avril	24,0	6,2	27,8	4,2	
	20 Mai	21,0	6,8	26,45	6,75	
	8 Juin	19,0	non dosé	non dosé	non dosé	
Gaines	9 Avril	18,4	non dosé	non dosé	non dosé	
	27 Avril	11,5	5,05	12,20	1,2	
	20 Mai	8,3	4,85	9,85	1,6	
	8 Juin	6,6	3,2	13,65	1,8	
Tiges	20 Mai	7,0	2,4	13,45	0,9	
	8 Juin	5,0	2,8	13,5	1,5	
Inflorescences			1,95	5,85	3,5	
Plante entière	9 Avril		9,2	24,5	3,9	
	27 Avril		5,30	19,8	2,7	
	20 Mai		4,3	14,7	2,7	
	8 Juin		3,1	13,4	2,35	

(Tous les chiffres de ce tableau sont la moyenne des résultat obtenus au cours de 2 ou 3 fractionnements indépendants sur Dowex 1).

relativement peu avec l'âge dans les différents organes, mais la proportion d'acide malique est un peu plus élevée dans les tiges que dans les gaines ou les limbes (comme chez les dactyles). Les limbes de fétuque sont plus riches en acide malique (26,4-29,4 contre 14,7-22,7 mg/g) et en acide citrique (4,2-6,7 contre 1,7-3,8 mg/g), que leurs homologues des dactyles. L'acide quinique existe en quantité équivalente ; les proportions (tableau V) font apparaître cette différence au niveau de l'acide quinique (17,1-23,7 contre 25,0-28,1 p. 100). Les fleurs sont particulièrement riches en acide citrique (31 p. 100 des acides organiques totaux).

B. Composition des plantes entières (tableaux IV et V, graphiques 1 et 2).

ACIDES ORGANIQUES TOTAUX.

La composition des plantes entières suit les variations des proportions des différents organes : les gaines et les tiges étant plus pauvres en acides organiques que les limbes (2 à 2,5 fois moins) l'influence de l'âge se traduit par une diminution progressive des acides organiques totaux. Cette diminution est particulièrement importante chez la fétuque par

suite de la diminution plus importante de la proportion des limbes plus riches en acides organiques que ceux du dactyle.

Acides organiques individuels

La diminution progressive de la proportion des limbes et l'augmentation corrélative de celle des tiges et des inflorescences entraînent une augmentation de la proportion de l'acide malique chez les deux espèces

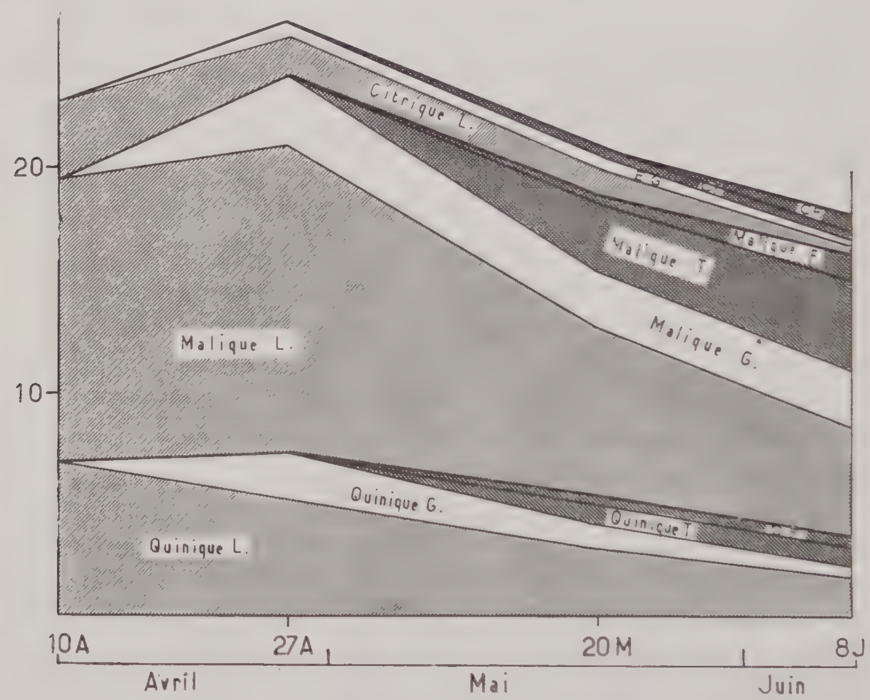


Fig. 11 — *Dactyles*. Contribution des différents organes à la composition en acides organiques de la plante entière

envisagées ; cette augmentation se fait soit aux dépens de l'acide quinique seul (fétuque), soit aux dépens de l'acide quinique et de l'acide citrique (dactyle) ; chez les deux espèces étudiées, (ayant reçu une forte fumure azotée), la proportion d'acide malique est plus forte et celle de l'acide citrique plus faible que celles trouvées dans le ray-grass anglais (Fauconneau 1958) n'ayant reçu aucune fumure ; l'influence de la fumure azotée est sans doute responsable de cette différence.

Chez le dactyle la proportion d'acide citrique diminue avec l'âge, ce qui est en accord avec Davies et Hugues (1954), cependant chez la étuque la proportion d'acide citrique augmente dans ses différents organes,

TABLEAU IV

Les acides organiques
des différentes parties d'un dactyle au cours de la croissance.

Organes	Dates de prélèvement	Acides organiques individuels (% des acides organiques totaux recouvrés sur colonne)				Acides organiques totaux en mg par g de M. S.
		Quinique	Succinique	Malique	Citrique	
Limbes	10 Avril	28,15	4,5	53,4	13,9	27,5
Limbes	27 Avril	25,0	2,9	63,3	8,8	32,7
Limbes	20 Mai	25,3		65,6	9,9	28,5
Limbes	8 Juin	27,0		67,8	5,2	33,5
Gaines	27 Avril	30,47		57,9	11,6	16,8
Gaines	20 Mai	28,05		59,35	12,5	14,5
Gaines	8 Juin	14,13		78,15	7,7	15,25
Tiges	20 Mai	19,4		72,9	7,6	16,7
Tiges	8 Juin	14,6		78,4	7,0	13,05
Fleurs	8 Juin	26,2		58,9	15,0	9,5
Plante entière	10 Avril	28,7	3,5	54,4	13,4	23,6
Plante entière	27 Avril	26,1	2,1	62,3	9,3	27,1
Plante entière	20 Mai	26,8		63,4	9,9	21,3
Plante entière	8 Juin	20,9		72,05	7,0	17,25

(Tous les chiffres de ce tableau sont la moyenne des résultats obtenus au cours de deux ou trois fractionnements indépendants sur Dowex 1). M. S. = matière sèche.

TABLEAU V

Les acides organiques
des différentes parties d'une fétuque au cours de la croissance.

Organes	Dates de prélèvement	Acides organiques individuels (% des acides organiques totaux recouvrés sur colonne)			Acides organiques totaux en mg par g de M.S.
		Quinique	Malique	Citrique	
Limbes	10 Avril	23,7	65,0	11,3	45,3
Limbes	27 Avril	16,3	72,6	11,1	38,3
Limbes	20 Mai	17,1	66,05	16,9	40,1
Gaines	27 Avril	27,4	66,2	6,3	18,4
Gaines	20 Mai	29,8	60,5	9,6	16,3
Gaines	8 Juin	17,1	73,4	9,6	18,6
Tiges	20 Mai	14,5	79,9	5,6	16,85
Tiges	8 Juin	15,9	75,6	8,5	17,9
Fleurs	8 Juin	17,2	51,7	31,1	11,3
Plante entière	10 Avril	24,4	65,2	10,3	37,5
Plante entière	27 Avril	19,1	71,1	9,8	27,8
Plante entière	20 Mai	19,8	67,7	12,5	21,7
Plante entière	8 Juin	16,5	71,1	12,4	18,9

(Tous les chiffres de ce tableau sont la moyenne des résultats obtenus au cours de deux ou trois fractionnements indépendants sur Dowex 1). M.S. = matière sèche.

mais varie peu chez la plante entière ; chez le ray-grass ne recevant pas de fumure azotée, la proportion d'acide citrique augmente avec l'âge même dans la plante entière, ce qui est dû à l'importance relativement plus grande de l'inflorescence particulièrement riche en acide citrique.



FIG. 2. — *Fetuques*. Contribution des différents organes à la composition en acides organiques de la plante entière

La différence fondamentale entre dactyle et fétuque réside dans l'évolution différente de l'acide citrique dans les diverses parties des plantes ; le calcium (GUEGUEN 1959) présente une différence analogue ; la teneur des limbes de fétuque en calcium est très élevée et augmente régulièrement avec l'âge (5,5-9,5 mg/g) tandis qu'elle est plus faible

(4,2-5,5 mg/g), chez le dactyle et elle n'augmente qu'à la floraison. Les gaines des deux espèces ont des teneurs voisines en calcium, mais leur évolution comme celle de l'acide citrique est différente ; la teneur en calcium diminue avec l'âge chez le dactyle (comme l'acide citrique), cependant qu'elle varie peu et augmente légèrement à la floraison chez la fétuque.

L'influence de l'âge sur la composition en acides organiques des deux graminées étudiées est surtout liée aux variations des proportions entre les différentes parties de la plante lors de la croissance (tableau I), en effet les limbes et les tiges ont des compositions très différentes (acides organiques totaux et proportions de ceux-ci), les gaines ont des compositions intermédiaires qui se rapprochent de celles des tiges.

RÉSUMÉ

Nous avons poursuivi l'étude des acides organiques des plantes fourragères par l'analyse des organes d'un dactyle et d'une fétuque des prés ayant reçu une forte fumure azotée ; le fractionnement est effectué à l'aide du Dowex 1 (formate) suivant une méthode déjà décrite (FAUCONNEAU 1958).

L'influence du stade de développement a été étudiée sur les différents organes : les acides organiques totaux varient peu avec l'âge, mais beaucoup avec l'organe considéré (1,3-1,8 p. 100 de la matière sèche dans les gaines et les tiges contre 2,7-4,5 p. 100 dans les limbes), les fleurs sont particulièrement pauvres (1 p. 100).

La répartition des acides organiques varie également avec l'organe ; l'acide malique est plus abondant dans les tiges.

L'influence de l'âge est différente chez les deux espèces étudiées : chez le dactyle la proportion d'acide citrique diminue avec l'âge dans les limbes, les gaines et les plantes entières, tandis que chez les fétuques la proportion d'acide citrique augmente dans tous les organes ; la teneur en calcium des différentes parties des deux graminées étudiées suit une loi parallèle.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BENTLEY (L. E.). — *Nature*, **170**, 847, 1952.
DAVIES (C. W.), HUGUES (R. B.). — *J. Sci. Fd. Agric.*, **5**, 200, 1954.
FAUCONNEAU (G.), JARRIGE (R.). — Conférence Européenne des Herbages, p. 302, 1954.
FAUCONNEAU (G.). — *Ann. Agron. Physiol. Végét.* 1-13, 1958, suppl. I.
HULME (A. C.), RICHARDSON. — *J. Sci. Fd. Agric.*, **5**, 221, 1954.

INFLUENCE D'UN TRAITEMENT AUX SILICONES SUR LA MATURATION DU RAISIN

PAR

Ch. POUX
Station centrale de Technologie
des Produits végétaux, Narbonne

Depuis les travaux déjà anciens sur la maturation des fruits de Frémy (1), on sait que le développement de ces derniers est entravé par l'application de vernis sur leur surface. La conclusion de cet auteur est que « la respiration et la transpiration des fruits sont deux fonctions indispensables pour leur développement ».

En ce qui concerne les échanges respiratoires, Genevois (2), interprétant des expériences plus anciennes de Gerber (3) sur les raisins montre que l'oxygène absorbé ou le gaz carbonique dégagé rapportés au grain vont en croissant jusqu'à la véraison, alors qu'après ce phénomène l'activité respiratoire, toujours rapportée au grain, reste à peu près constante. L'activité respiratoire est indispensable à la multiplication cellulaire qui s'effectue dans le jeune fruit pendant la période de croissance entre la nouaison et la véraison.

Pour ce qui est de l'émission de vapeur d'eau, les fruits en émettent des quantités variables selon leurs espèces, la température et l'état hygrométrique de l'air (Ulrich (4)). Pour le raisin des mesures que nous avons effectuées sur le Carignan comme cépage, autour de la période de la véraison nous permettent de penser que les grains de cette variété perdent leur poids d'eau entre huit et douze jours selon les valeurs de l'état hygrométrique de l'air. Pendant les périodes chaudes et humides, le grain de raisin acquiert un développement plus élevé en poids que pendant les périodes sèches.

En 1957, P. Durquety et P. Magimel (5) étudient l'action des films hydrofuges d'organosiliciques sur le cycle végétatif et sur la résistance des végétaux à la sécheresse. Ces auteurs montrent que le dépôt de ces produits sur les bourgeons déclenche un retard spectaculaire des différentes phases du cycle végétatif. Le dépôt sur les feuilles et inflores-

cences, véritable cuticule artificielle, augmente fortement la résistance de l'organe végétal à la sécheresse. De plus, le film d'organo-silicique déposé sur la feuille ne gêne pas le transit des gaz à travers la couche déposée qui reste perméable à l'oxygène, à l'azote, et au gaz carbonique.

A la suite de ces travaux, il nous a paru intéressant de tenter des applications d'un de ces organo-siliciques sur le raisin et d'observer quelle était la répercussion sur le développement et la composition des grains.

Essais préliminaires.

Au cours de l'année 1957, un certain nombre d'essais d'application de silicones sur la pellicule du raisin par trempage du fruit dans une solution de graisses silicones dans des solvants organiques, éther sulfurique et acétate d'éthyle avaient été expérimentés. Les graisses silicones étaient des produits « Siss » de la Société Saint-Gobain, type F. 4 et F. 6. Les résultats de ces expériences montrèrent que les grappes traitées perdaient plus de poids que les grappes témoins, lorsqu'elles étaient laissées à l'air libre détachées du cep, alors que l'on pouvait s'attendre à un effet inverse. Tout se passait donc comme si les grains enduits d'une mince couche de silicones transpiraient plus que les grains témoins. On pensa donc à l'effet probable de la solubilité de la cuticule naturelle du grain de raisin dans les solvants employés. Cette cuticule naturelle qui forme la pruine du raisin serait selon cette hypothèse plus protectrice vis-à-vis des phénomènes transpiratoires que le film de silicones déposées.

Afin d'éviter la solubilisation de cette cuticule naturelle dans les solvants sous l'effet du trempage des grappes, nous avons au cours de l'année 1958, expérimenté l'application d'un film hydrofuge par pulvérisation d'une émulsion de silicones. Le produit expérimenté est une émulsion à 35 p. 100 de diméthylpolysiloxanes dans l'eau dont l'émulsifiant appartient à la classe des non ioniques. Ce produit porte la dénomination commerciale : émulsion Si 35 B et est fabriqué par les Etablissements Saint-Gobain. Il répond à une classe de composés de formule suivante :

$$CH_2 - \underset{CH_3}{\overset{CH_3}{Si}} - O \left[\underset{CH_3}{\overset{CH_3}{Si}} - O \right]_n - \underset{CH_3}{\overset{CH_3}{Si}} - CH_3$$

Sa viscosité est de 350 centistokes.

Mesure de la transpiration de grappes détachées traitées et non traitées.

Un certain nombre de grappes entières ont été prélevées sur des rangées de ceps voisines des rangées devant servir ultérieurement à l'expérimentation sur vigne. Elles ont été choisies et groupées par deux,

de poids sensiblement voisin, et pendues côte à côte sur une tige horizontale. L'incision de chaque grappe avait été parafinée pour prévenir une dessiccation de la blessure. Une grappe de chaque groupe était pulvérisée avec une solution aqueuse de l'émulsion aqueuse de silicone déjà citée, diluée au 1/20 de telle sorte que l'on ait pour chaque groupe de grappes de poids différents un essai témoin et un traité. L'atmosphère était balayée légèrement par un courant d'air provoqué par un ventilateur à orientation variable et alternative. Sur la même tige étaient également placés à hauteur des grappes un thermomètre et un évaporomètre de Piche. La perte de poids était suivie par pesée de chaque grappe toutes les demi-heures. On sait que la perte de poids provoquée par le dégagement de gaz carbonique par respiration est négligeable ; au contraire, la perte d'eau par transpiration est assez voisine de la perte de poids total (4). Sans prétendre par ces mesures donner une idée de la transpiration des grappes en valeur absolue, on peut penser que les valeurs relatives obtenues, au moins au cours de la première heure donnent une idée voisine de la réalité Quoiqu'il en soit les mesures effectuées offrent des valeurs comparables, permettant de déceler la variation imposée par le traitement.

Voici, résumés dans le tableau I, les résultats d'une de ces expériences.

TABLEAU I

	Poids des grappes en g	Durée de l'expérience								
		Après 1 heure (entre 0 et 1e heure)			Après 2 heures (entre 1e et 2e heure)			Après 3 heures (entre 2e et 3e heure)		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
			%	%		%	%		%	%
1 Témoin	24	1	4,16	100	1	4,16	100	0,8	3,33	100
2 Traité (silicones)	24	0,75	3,12	75,0	0,66	2,75	66,1	0,6	2,5	75,0
3 Témoin	19,5	1	5,12	100	0,83	4,25	100	0,7	3,58	100
4 Traité (silicones)	20	0,75	3,75	73,2	0,66	3,33	78,3	0,55	2,75	76,8
5 Témoin	35	1	2,85	100	1	2,85	100	0,77	2,21	100
6 Traité (silicones)	36,5	1	2,73	95,7	0,83	2,27	79,6	0,77	2,12	95,9
7 Témoin	29,5	1,25	4,23	100	1,16	3,93	100	1	3,38	100
8 Traité (silicones)	26,5	1	3,77	89,1	0,83	3,13	79,6	0,75	2,83	83,7

1 = Perte de poids horaire en g par grappe
2 = Pourcentage de la perte de poids horaire ou transpiration horaire en g pour 100 g de matière fraîche.
3 = Pourcentage de la transpiration horaire du raisin traité par rapport au témoin.

On peut voir que :

— L'effet d'une pulvérisation d'une émulsion de silicones est l'inverse de l'effet obtenu par trempage des grappes dans une solution organique de silicones.

— Toute es grappes traitées présentent une transpiration horaire nettement plus faible que le témoin correspondant.

— La diminution de transpiration provoquée par le traitement n'est pas constante d'une grappe à l'autre. Il y a des variations plus importantes sur les jeunes raisins (cas des petits grains n° 1, 2, 3, 4) que sur les grains plus évolués (n° 5, 6, 7, 8) comme cela est connu pour d'autres fruits. Mais il peut aussi exister des différences morphologiques individuelles (n° 6).

— En moyenne pour cette expérience, on peut calculer que l'économie de la perte d'eau par transpiration, provoquée par le traitement, est de l'ordre de 18 p. 100.

Expérimentation sur vignes.

Les derniers essais ayant montré la possibilité de ralentir la transpiration des grains de raisin, on a effectué sur une rangée (n° 1) de 14 pieds un premier traitement le 15 juillet. A l'aide d'un pulvérisateur à pression à main on a pulvérisé sur toutes les grappes des 14 pieds, 1 250 ml d'une solution de l'émulsion de silicones SI 35 B diluée 20 fois avec de l'eau.

Au cours de l'opération on a surtout visé les grappes en évitant autant que possible le feuillage. La rangée suivante n° 2 servait de témoin. Le 31 juillet un deuxième traitement a été effectué sur la rangée n° 1 et un premier traitement sur la rangée n° 3, la rangée n° 4 servant de témoin.

On avait donc :

Rangée 1 : 2 traitements les 15 et 31 juillet.

Rangée 2 : 0 traitement Témoin.

Rangée 3 : 1 traitement le 31 juillet.

Rangée 4 : 0 traitement Témoin.

Le 12 août, début de la véraison, on a prélevé un échantillon de 700 grains dans la rangée n° 1, et un échantillon de 900 grains dans la rangée témoin n° 2, par ciselage de 2 à 3 grains par grappe. Les grains ont été ensuite ciselés au ras du pédoncule, comptés et pesés par 100 grains. Les résultats sont consignés dans le tableau II.

La différence entre les moyennes du traité, m_1, et du témoin, $\overline{m}_2$, est significative. On observe donc un ralentissement du grossissement du grain sous l'effet du premier traitement. La diminution de la moyenne du poids des traités par rapport à la moyenne des témoins est de 26 p. 100.

Le tableau III donne pour le prélèvement du 12 août au stade du début de la véraison la composition par 100 grains en ce qui concerne les sucres en grammes et les acides libres exprimés en milliéquivalents. Le rapport A/P donne le nombre de milliéquivalents d'acides libres par gramme de fruit et le rapport S/P les grammes de sucre par gramme de fruit frais.

Tableau II

Prélèvement du 12 Août 1958			
Traité Rangée n° 1		Témoin Rangée n° 2	
	Poids de 100 grains (en g)		Poids de 100 grains (en g)
1	79	1	88,5
2	70	2	90
3	78	3	82,5
4	69,5	4	85
5	67,5	5	95,5
6	71	6	90
7	69	7	90,5
		8	97,5
		9	89
Moyenne $\overline{m}_1 = 72$ $\sigma_1 = 4{,}5$ $n_1 = 7$ (Grains colorés : 17 p. 100)		Moyenne $\overline{m}_2 = 89{,}8$ $\sigma_2 = 5{,}9$ $n_2 = 9$ (Grains colorés 27 p. 100)	

Tableau III

Prélèvement du 12 Août 1958 — Résultats pour 100 grains					
Rangées	Poids (g.)	Acidité (meq.)	Sucre (g.)	$\frac{A}{P}$	$\frac{S}{P}$
1 Traité	71	34	2,7	0,478	0,038
2 Témoin	90	38,3	4,2	0,425	0,046

Tableau IV

Prélèvement du 17 Septembre 1958							
Traité Rangée n° 1		Témoin Rangée n° 2		Traité Rangée n° 3		Témoin Rangée n° 4	
	Poids de 100 grains en g.		Poids de 100 grains en g.		Poids de 100 grains en g.		Poids de 100 grains en g.
1	165,5	1	219	1	182	1	190,5
2	159,5	2	211	2	187	2	211
3	167	3	211	3	186	3	185,5
4	165,5	4	211	4	171	4	217
5	168,5	5	220	5	188	5	184
6	157	6	213,5	6	180,5	6	185,5
7	164,5	7	226	7	180	7	185,5
8	167,5	8	215,5	8	181,5	8	182,5
Moyenne $\overline{m}_1 = 164{,}3$ $\sigma_1 = 4{,}04$ $n_1 = 8$		Moyenne $\overline{m}_2 = 215{,}8$ $\sigma_2 = 5{,}42$ $n_2 = 8$		Moyenne $\overline{m}_3 = 182$ $\sigma_3 = 5{,}4$ $n_3 = 8$		Moyenne $\overline{m}_4 = 192{,}6$ $\sigma_4 = 11{,}52$ $n_4 = 8$	

On observe que l'essai traité aux silicones (n° 1) a une concentration en acides plus élevée que le témoin (n° 2). On serait amené à admettre ou que les acides ont migré davantage vers les grains traités au cours du grossissement, ou qu'ils se sont formés davantage in situ ou bien que la combustion des acides a été ralentie (nous reviendrons sur cette hypothèse au cours de la discussion des résultats).

Le 17 septembre, date de la maturité industrielle, c'est-à-dire le moment où la valeur moyenne du poids des grains passe par un maximum (7), ceci étant observé par des prélèvements périodiques sur d'autres rangées voisines de la même parcelle, nous avons effectué sur chacune des rangées 1, 2, 3 et 4 un échantillonnage de 800 grains comme précédemment. Les résultats sont consignés dans le tableau IV.

La différence entre la moyenne des poids des échantillons de la parcelle ayant subi deux traitements, $\overline{m}_1$ et la moyenne de la parcelle témoin $\overline{m}_2$ est significative.

Au contraire, la différence entre la moyenne de la rangée 3, m_3 et la moyenne de la rangée 4, $\overline{m}_4$, n'ayant subi qu'un seul traitement tardif n'est pas ou peu significative.

Le ralentissement du grossissement du grain sous l'effet du traitement s'observe seulement lorsque ce traitement est effectué au stade de jeunesse du fruit, stade voisin de la nouaison dans notre cas ; on ne l'observe pratiquement plus lorsque le traitement est effectué à la fin du stade herbacé du développement du grain, c'est-à-dire très près de l'époque de la véraison.

Le tableau V, donne pour les prélèvements du 19 septembre à maturité la composition du fruit par 100 grains, ainsi que les rapports A/P et S/P/.

TABLEAU V

Prélèvement du 17 Septembre 1958. Résultats pour 100 grains

Rangées	Poids (g.)	Acidité (méq.)	Sucre (g.)	$\frac{A}{P}$	$\frac{S}{P}$
1 Traité..........	164	12,3	30,7	0,075	0,187
2 Témoin.........	216	15,6	38,7	0,072	0,179
3 Traité..........	182	13,4	31,9	0,073	0,175
4 Témoin.........	192	15,3	32,5	0,079	0,169

On voit que la migration des sucres s'est effectuée normalement sur les rangées traitées et sur les témoins. La concentration finale par rapport au poids frais est légèrement en faveur des rangs traités surtout en ce qui concerne celui qui a subi deux traitements (n° 1). Toutefois, l'examen des deux témoins 2 et 4 révèle une légère différence dans la marche de la maturation, le rang 4 présentant un léger retard sur le rang 2. Ceci

peut être dû, soit à l'hétérogénéité de la parcelle soit à la faiblesse du nombre de ceps traités.

L'évolution des acides révèle que leur combustion s'est déroulée à peu près de la même façon dans les 4 rangées, les rapports A/P étant très voisins pour les rangs 1, 2, 3, le rang 4 présentant une valeur légèrement plus élevée concordant d'ailleurs avec le retard de maturation constaté à propos des sucres.

Discussion.

Nous sommes partis de l'observation de DURQUETY et MAGIMEL (5) que le film hydrofuge de silicones ralentit les échanges de vapeur d'eau sans influer sur les échanges gazeux, absorption d'oxygène et dégagement de CO_2.

Si comme on peut le penser le poids moyen du grain, observé à différents stades de son évolution par des prélèvements successifs, peut être considéré comme le résultat de deux phénomènes : l'un correspondant à un gain continu de matériaux apportés au grain par la sève, principalement sous l'influence des conditions héliothermiques du milieu environnant (8) ; l'autre correspondant à une perte continue de vapeur d'eau par transpiration soumise aussi aux conditions du milieu, on est amené à penser qu'en diminuant les pertes par transpiration (cas des rangs traités), les conditions héliothermiques du milieu restant constantes, les rangées témoins devraient donner des grains d'un poids plus faible que les grains des rangs traités. Or, c'est le contraire que l'on observe.

D'autre part, les travaux de GENEVOIS et GERBER (2 et 3) montrent que l'oxygène absorbé et le CO_2 dégagé rapporté au grain vont en croissant de la nouaison à la véraison et que l'activité respiratoire est liée à la multiplication des cellules qui s'effectue dans le jeune fruit durant cette période. On peut donc penser que toute cause qui modifiera à ce stade l'activité respiratoire doit affecter la multiplication cellulaire et par suite le poids du jeune fruit.

Le fait que dans nos expériences, le premier traitement effectué le 15 juillet, donc très peu après la nouaison, a provoqué un effet dépressif sur la croissance des jeunes grains, alors que le deuxième effectué le 31 juillet (rangée 3) à l'approche de la véraison, moment où l'activité cellulaire a cessé, n'a pratiquement causé aucun effet, nous permet de nous demander si, en même temps que l'on a ralenti les échanges de vapeur d'eau, on n'a pas aussi ralenti les échanges gazeux. L'expérimentation permettant de se rendre compte de ce phénomène, par exemple une étude à l'appareil de Warburg des échanges respiratoires de grains traités et non traités, n'a pas été effectuée, pour la simple raison qu'au moment où cette étude paraissait s'imposer, il n'y avait plus de grains au stade de

végétation considéré. Toutefois, en plus des arguments déjà cités en faveur de l'hypothèse du ralentissement de tous les échanges, de vapeur d'eau et de gaz, on peut faire d'autres remarques.

Au cours des essais préliminaires le ralentissement des échanges de vapeur d'eau imprimé par le traitement est de l'ordre de 18 p. 100 ; dans l'essai au vignoble le ralentissement observé sur le développement des grains traités précocement est de l'ordre de 26 p. 100 ; ce sont des chiffres du même ordre de grandeur.

Au moment de la véraison, nous avons vu que la concentration en acides du grain est plus élevée dans les grains traités que dans les grains témoins. Ce fait s'explique facilement si l'on admet une diminution de l'intensité respiratoire des grains traités et, partant, de la combustion des acides organiques. Il est plus difficile de s'expliquer comment les acides migreraient davantage chez les uns que chez les autres. Reste à ce sujet l'hypothèse d'une plus grande formation in situ des acides organiques chez les grains traités. Dans l'état actuel de nos connaissances sur la formation de ces acides, soit par la voie du cycle de KREBS ou des cycles dérivés, soit par la voie des carboxylations, l'hypothèse de la formation in situ des acides organiques implique au total un dégagement plus faible de CO_2 chez les grains traités que chez les témoins.

Il faudrait donc admettre dans ce cas un passage préférentiel de certains gaz déterminés par la membrane artificielle. On peut aussi penser à un manque d'arrivée d'oxygène satisfaisant à la combustion complète des glucides dans le fruit traité.

Tous ces ordres de faits rendent donc probable la diminution des échanges gazeux provoquée par le film d'organosilicique déposé sur les grains à la suite du traitement.

Enfin, une observation d'ordre physiologique suggérée par cette expérimentation : lorsqu'on provoque une perturbation dans le développement du grain de raisin au cours de la phase nouaison-véraison, on assiste à sa répercussion au cours de la deuxième phase du développement véraison-maturité. Tout se passe comme si la croissance du grain au cours de la deuxième phase du développement était influencée par des substances élaborées au cours de la première. Mais ceci rentre dans le grand problème du déterminisme des facteurs internes du développement du grain de raisin.

Conclusion.

L'application d'un film d'organo-silicique sur la pellicule du grain de raisin provoque suivant le moment de l'application un changement plus ou moins prononcé du métabolisme du fruit.

Dans le cas du produit expérimenté (SI 35 B), si l'on peut constater un ralentissement dans les échanges de vapeur d'eau, il est probable que

l'on a provoqué en même temps un ralentissement des échanges respiratoires.

Cependant la chimie des silicones offre déjà à l'expérimentateur une gamme de nombreux produits ; le nombre des émulsifiants permettant leur pulvérisation sur les fruits en solution aqueuse est sans doute non moins élevé. Il n'est donc pas impossible que par des combinaisons de ces deux sortes de produits, on ne puisse arriver à imprimer une orientation aux échanges de vapeur d'eau et de gaz. Une étude préalable de ces échanges sur les fruits détachés permettant de dégager le sens de la variation provoquée à la fois sur les phénomènes de transpiration et de respiration, se révèle comme un moyen d'approche efficace dans la recherche de produits valables.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Frémy (E.). — Recherches chimiques sur la maturation des fruits. *C. R Ac. Sc.*, **19,** 784-792, 1844.

(2) Genevois (L.). — Formation et évolution biologique des acides. *Rev. Vit.*, **88,** 107, 1938.

(3) Gerber. — Recherches sur la maturation des fruits charnus. *Ann. Sc. Nat.*, **4** (8e série), 1896.

(4) Ulrich (L.). — La vie des fruits. Éd. Masson et Cie, p. 215, 1952.

(5) Durquety (P. M.) et Magimel (P.). — Action de films hydrofuges d'organo-siliciques sur le cycle végétatif et sur la résistance de végétaux à la sécheresse. Application en agronomie. *C. R. Ac. Sc.*, **245,** 723-725, 1957.

(6) Magimel (P.) et Durquety (P. M.). — Action de différents dopes industriels sur les fluides de silicones. Utilisation sur le végétal. *Prog. Agr. Vit.*, **75,** 11-17, 1958.

(7) Poux (Ch.). — Relation entre le poids des sucres et le poids de matière fraîche dans les raisins de différentes variétés de Vitis Vinifera au moment de la maturité. *C. R. Ac. Agr.*, **36,** 605, 1950.

(8) Branas (J.). — Éléments de Viticulture générale. Montpellier, 1946.

NOUVELLES TECHNIQUES DE DOSAGE DU PHOSPHORE

PAR

G. DUCET et G. VANDEWALLE
Station centrale de Physiologie végétale, Versailles.

Dans un travail précédent (1), nous avions décrit une technique de dosage de faible quantités de composés phosphorés.

Nous avons observé que le complexe phosphomolybdique extrait dans l'alcool isobutylique permet une colorimétrie qui rend possible l'appréciation de quantités de phosphore de 1 à 1 000 γ dans la même prise d'essai. Cette méthode, basée sur la mesure et la comparaison des densités optiques des solutions isobutyliques, à diverses longueurs d'ondes, permet de doser le phosphore sans détruire le composé phosphomolybdique. Il est encore possible de mesurer la radioactivité de cette solution et d'en déduire la radioactivité spécifique. Enfin, l'extraction quantitative du phosphore minéral par l'alcool isobutylique en présence de molybdate laisse en solution aqueuse les composés phosphorés organiques. La mesure de la radioactivité de la solution aqueuse peut donc permettre le calcul du phosphore minéral intégré dans les fractions organiques.

I. — TECHNIQUE

1. — Réactifs.

a) alcool éthylique, redistillé sur KOH, puis sur Cl_2Sn ;

b) alcool isobutylique, redistillé sur Cl_2Sn.

Il est nécessaire de redistiller avec Cl_2Sn pour éliminer certaines substances qui interfèrent dans l'ultra-violet, déplacent le maximum de 310 mμ vers 330 mμ et enlèvent toute proportionnalité, surtout pour les faibles quantités de phosphore (1 à 10 γ).

c) mobybdate d'ammonium, à 2,5 p. 100, avec 1 goutte de SO_4H_2 concentré conservation 1 mois ;

d) SO_4H_2 10 N ;

e) SO_4H_2 N ;

f) OH_2 bi-permutée ou bi-distillée.

2. — Appareillage.

Deux ampoules à décanter de 50 ml par dosage.

3. — Mode opératoire.

a) Faibles quantités, de 1 à 100 γ.

Extraction.

Pour 10 ml, ajouter :
0,8 ml SO_4H_2 10 N ;
2 ml molybdate d'ammonium à 2,5 p. 100 ;
6 ml alcool isobutylique.

Agiter 60 secondes, laisser décanter. Récupérer la couche aqueuse dans une deuxième ampoule ; y ajouter 3 ml d'alcool isobutylique. Agiter 30 secondes. Laisser décanter.

La couche alcoolique doit être incolore après cette deuxième extraction. Si elle est colorée en jaune, l'erreur provient d'un des facteurs suivants :

Extraction mal faite.

Trop de phosphore, il faut mettre davantage de molybdate.

Substances étrangères, tel le mannitol, formant avec le molybdate un complexe, réduisant ainsi la quantité de molybdate nécessaire à la formation du complexe phosphomolybdique. Dans ce cas, nous mettons :
— 6 ml molybdate.
— 1,2 ml SO_4H_2 10 N.

Lavage.

Le contenu de chaque ampoule est lavé deux fois avec 2 à 3 ml de SO_4H_2 N, pour éliminer les traces de molybdate.

Mettre à volume dans des fioles de 10 ml avec alcool éthylique.

Note : Pour les faibles concentrations en P, 1 à 5 γ, il est absolument nécessaire d'employer de l'alcool éthylique et isobutyrique fraîchement redistillé sur Cl_2Sn.

b) Grandes quantités (100 à 1 000 γ).

Pour un volume de 10 ml, nous ajoutons :
6 ml de molybdate d'ammonium à 2,5 p. cent.
1,2 ml de SO_4H_2 10 N.
12 à 15 ml d'alcool isobutylique.

Même technique d'extraction et de lavage que pour les faibles quantités.

Mettre à volume dans des fioles de 20 ou 25 ml.

4. — Colorimétrie.

Suivant les concentrations en phosphore, nous effectuons les lectures à des longueurs d'ondes différentes : 310 mμ, 330 mμ, 350 mμ, 375 mμ 400 mμ, 425 mμ, 450 mμ.

Dans les régions intéressantes du spectre, les lectures sont faites à 3 longueurs d'ondes différentes, afin de vérifier la constance des rapports des densités optiques car quelquefois, dans des jus de végétaux verts, des substances interfèrent et font que ces rapports sont transformés (fig. 1).

Dans ce cas, nous employons la méthode au Cl_2Sn (1).

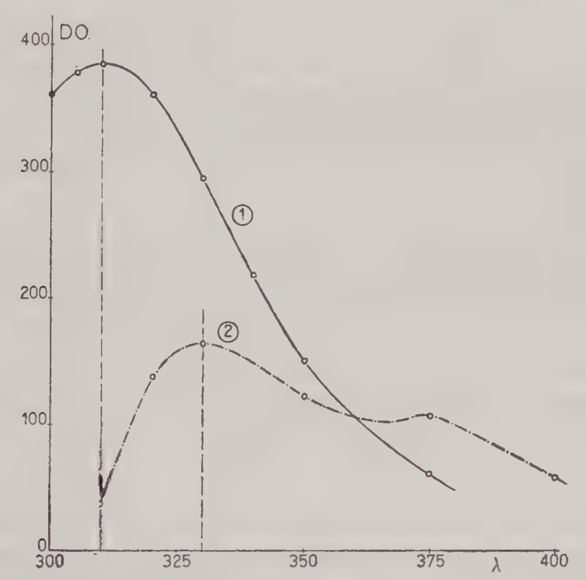


Fig. 1. — Spectre d'absorption de l'acide phosphomolybdique. — Courbe 1 : acide phosphomolybdique pur. — Courbe 2 : acide phosphomolybdique après début de réduction.

Note : Pour les faibles concentrations en phosphore, de 1 à 100 γ, il est indispensable que le liquide soit parfaitement clair. S'il y a des particules, filtrer sur verre frité nº 1.

5. — Résultats.

a) Vérification de la loi de Beer.

La loi de Beer se vérifie dans les longueurs d'ondes suivantes : 310 mμ, 330 mμ, 350 mμ, 375 mμ, 400 mμ, 425 mμ, 450 mμ et pour des concentrations en P de 1 à 1 000 γ, si la densité optique a une valeur comprise entre environ 0,2 et 1,5. Pour les concentrations faibles (1 à 10 γ), la loi de Beer est suivie au voisinage immédiat de la longueur d'onde au maximum d'absorption. Le maximum d'absorption est à 310 mμ (fig. I, courbe 1).

b) **Stabilité de la couleur.**

La densité optique du complexe phosphomolybdique présente un maximum stable pendant un minimum de 4 heures, après l'extraction. Puis elle décroît très lentement

Les échantillons doivent être soigneusement conservés à l'obscurité.

Pour des dosages comparatifs, les extractions doivent être effectuées le même jour et la colorimétrie peut être effectuée 1 ou 2 jours après.

II. — DOSAGE DU PHOSPHORE PAR RADIOACTIVITÉ

Pour étudier l'incorporation du P minéral dans les composés organiques des extraits végétaux, l'utilisation du phosphore marqué augmente considérablement la sensibilité du dosage.

Seul, le phosphore minéral donne, avec le molybdate, un composé soluble dans l'alcool isobutylique ; le phosphore organique reste dans la phase aqueuse.

Nous avons vérifié que de très petites quantités de phosphore sont extractibles dans les conditions décrites précédemment. La figure 3 montre qu'il est possible d'extraire totalement 0,1 γ de phosphore minéral.

Les résultats ont été obtenus en mesurant la radioactivité des solutions alcooliques de phosphomolybdate.

1. — Technique.

L'extraction se fait exactement comme il a été indiqué ci-dessus. Cependant, pour éviter de contaminer les compteurs à liquides, nous ajustons l'extrait alcoolique à volume connu, à l'aide d'une solution relativement concentrée d'acide phosphomolybdique obtenu par extraction de phosphore minéral (la solution alcoolique correspont à 100 γ de P par ml).

De cette manière, l'activité spécifique du P minéral est considérablement diminuée et une adsorption éventuelle par les parois du compteur ne peut donner lieu à une augmentation du mouvement propre.

Nous avons vérifié que le phosphore était complètement extrait en mesurant la radioactivité des liquides aqueux après extraction isobutylique. Ces liquides sont amenés à volume connu et comptés.

2. — Appareillage.

Une échelle Saphymo C. I. D.

Un compteur Tracerlab à immersion (TGC5).

Les courbes de la figure 3 montrent que l'extraction est quan-

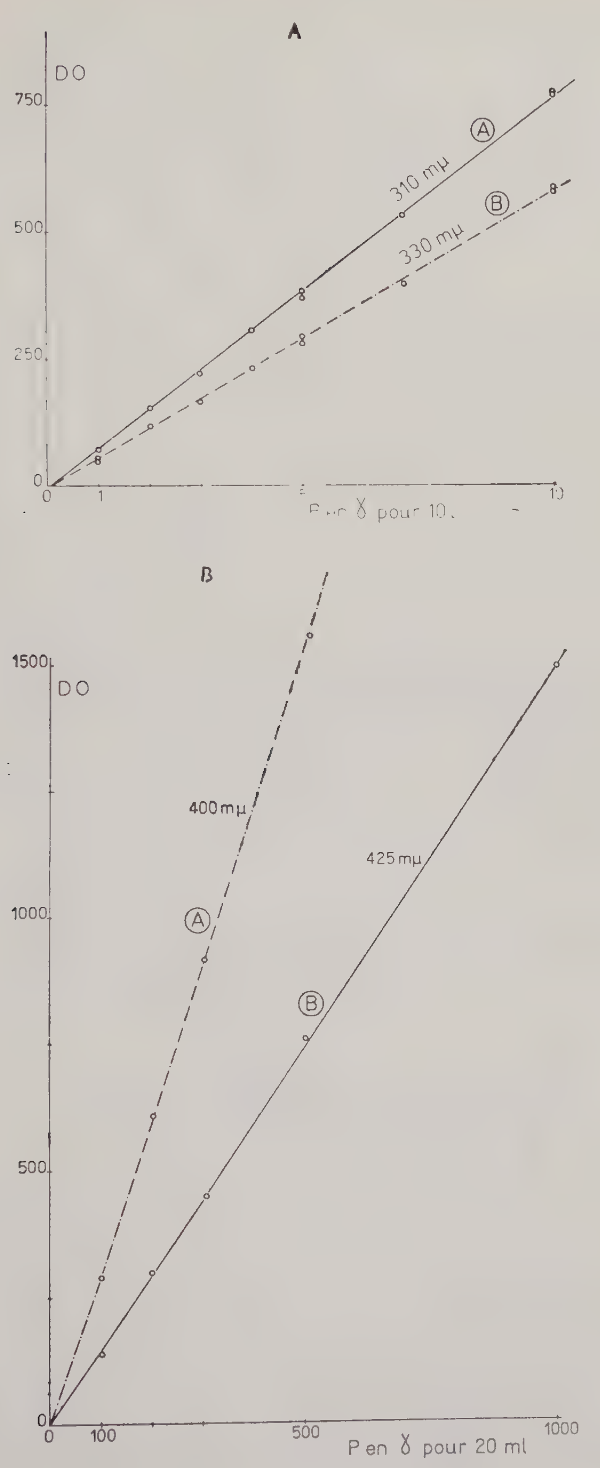


FIG. 2. — A : Dosage de petites quantités de Phosphore. — B : Dosage de fortes quantités de Phosphore.

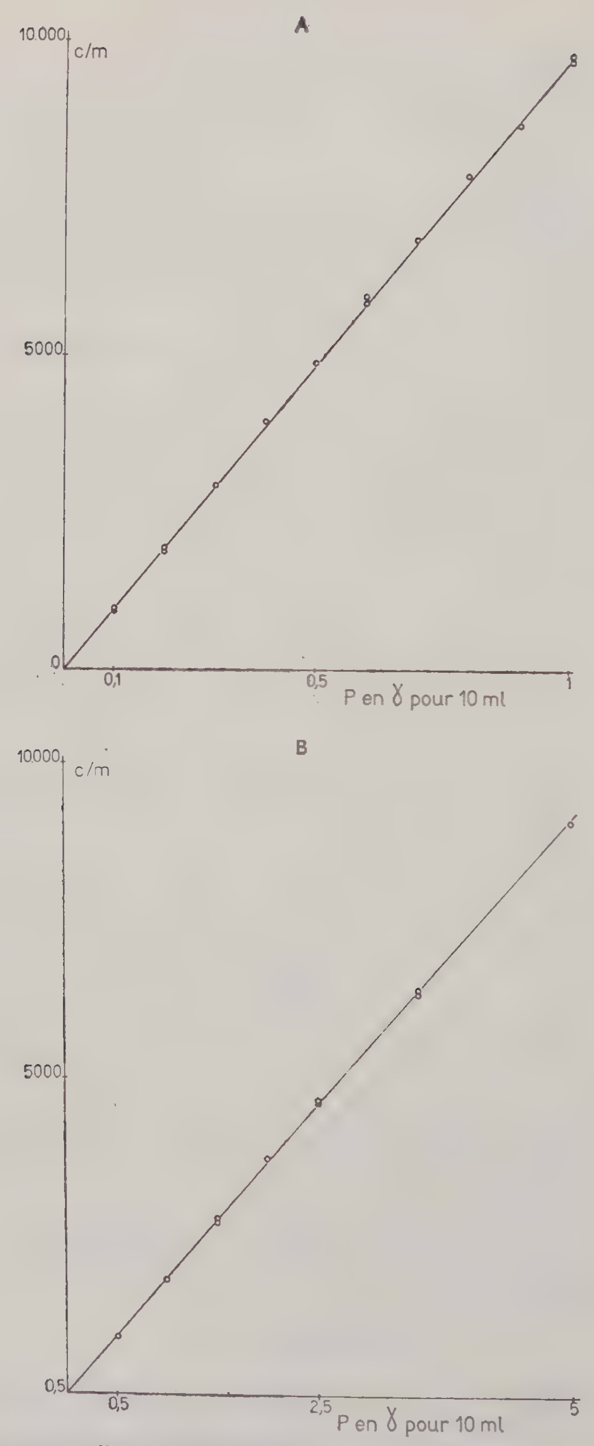


FIG. 3. — A : Dosage par radioactivité de très faibles quantités de Phosphore. — B : Dosage par radioactivité de faibles quantités de Phosphore.

titative. La radioactivité résiduelle du liquide aqueux ne provient ni du phosphore minéral non extrait ni de pyrophosphate radioactif comme nous l'avons vérifié par hydrolyse acide.

Il semble que cette radioactivité résiduelle relativement importante — 1 p. 100 de la radioactivité totale — provienne d'une forme du phosphore ne donnant pas de complexe molybdique extractible par l'alcool isobutylique.

III. — PHOSPHORE TOTAL

Nous avons modifié la minéralisation décrite précédemment, qui consommait d'importantes quantités d'eau oxygénée très pure.

— Réactifs :

Acide sulfurique concentré.

Acide perchlorique d. 1,61.

Dans un matras de 25 ml, ajouter :

0,25 ml à 1 ml de SO_4H_2.

0,1 ml à 4 ml de ClO_4H.

— Minéralisation :

Chauffage à 130-150° pendant 4 à 8 heures.

L'étuve est ensuite montée à 200°-220° pendant environ 1 heure.

Les matras sont laissés jusqu'à décoloration complète (environ une nuit). Si besoin est, nous ajoutons 0,1 à 0,3 ml de ClO_4H et le chauffage est prolongé jusqu'à décoloration complète.

— Hydrolyse des pyrophosphates éventuellement formés.

Ajouter 5 ml OH_2 bi-permutée aux matras qui sont placés au bain-marie bouillant 20 minutes.

Neutraliser le contenu des matras après refroidissement, avec de la lessive de soude, en présence de phénol-phtaléine, jusqu'à teinte rose, puis juste décolorer avec SO_4H_2N.

Les échantillons sont prêts pour l'extraction.

IV. — PHOSPHORE MINÉRAL DANS LES EXTRAITS VÉGÉTAUX

Pour une prise d'essai de 3 ml, ajouter :

— 0,2 ml de ClO_4H.

Laisser en contact 15 à 20 minutes dans la glace.

Centrifuger 10 minutes à 4 000 g.

Extraire le phosphore minéral sur une partie aliquote du surnageant, avec la technique habituelle mais en tenant compte de la quantité d'acide perchlorique présente.

Ex: 2 ml sur (3 + 0,2) contiennent sensiblement 0,1 ml d'acide perchlorique 10 N. Ajouter 8 ml d'eau et 0,7 ml de SO_4H_2 10 N au lieu de 0,8 ml.

— Colorimétrie :

Il n'est pas toujours possible de doser par spectrophotométrie dans l'ultra-violet. En effet, des substances à caractère aldéhydique extraites également par l'alcool isobutylique provoquent un début de réduction de l'acide phosphomolybdique, indiquée par des valeurs aberrantes des rapports de densité optique à différentes longueurs d'ondes (fig. 1).

	Valeurs observées pour diverses extractions de P minéral	Valeurs normales du rapport
350 à 375 mμ..........	2,38-2,18-2,37, etc.	2,46 à 2,56
375 à 300 mμ..........	2,04-1,93-1,84, etc.	2,10 à 2,18

Il est alors préférable de colorimétrer la coloration bleue obtenue par réduction avec Cl_2Sn.

V. — CONCLUSIONS

L'extraction par alcool isobutylique a été utilisée pour la première fois par Berenblum et Chain en 1938.

Elle a été reprise par Lindberg et Ernster, Delsal, Wahler et Wollenberger et d'autres, avec diverses modifications mais les densités optiques sont mesurées toujours au maximum d'absorption soit dans la région du bleu soit dans l'ultra-violet.

L'observation que nous avions faite, sur la possibilité de mesure à diverses longueurs d'onde, permet d'augmenter considérablement la gamme de mesure en évitant les dilutions.

Cette méthode a été appliquée (Ducet et Rosenberg), (Baudet, Coic, Ducet), à différents problèmes de physiologie dans lesquels le ^{32}P était utilisé ; la mesure des radioactivités spécifiques est particulièrement aisée.

La précision est d'environ 5 p. 100 jusqu'à 10 γ et 2 p. 100 jusqu'à 1 000 γ.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ducet (G.) et Mencl (I.). — *Ann. Agro.*, **2 bis**, 17, 1957.
Berentblum (I.) et Chain (E.). — *Biochem. J.*, **32**, 286, 1938.
Delsal (J. L.) et Manhouri (H.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.* **40**, 1 169, 1958.
Wahler (B. E.) et Wollenberger (A.). — *Biochem. Ztschc.* **329**, 508, 1958.
Ducet (G.) et Rosenberg (A. J.). — *Ann. Agron.*, **1 bis**, *(sous presse)*, 1958.
Baudet (J.), Coïc (Y.) et Ducet (G.). — (En préparation).

Le Directeur-Gérant : B. Laclavière.

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 4-9-1959

Dépôt légal : 3e trimestre 1959 N° d'impression : 511

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

7, rue Keppler, PARIS. Tél. : Kléber 23-04, 23-20, 23-21.
Directeur : H. FERRU

ADMINISTRATION ET SECRÉTARIAT DE LA RÉDACTION :
149, rue de Grenelle, PARIS. Tél. INV. 98-57.

TARIF DES ABONNEMENTS POUR 1959

	FRANCE	ÉTRANGER	LE N°
SÉRIE A. — AGRONOMIE	4.000	4.600	800
SÉRIE A *bis*. — PHYSIOLOGIE VÉGÉTALE	1.500	1.900	500
SÉRIE B. — AMÉLIORATION DES PLANTES	2.600	3.000	800
SÉRIE C. — ÉPIPHYTIES	2.600	3.000	800
SÉRIE C *bis*. — ABEILLE	1.800	2.100	600
SÉRIE D. — ZOOTECHNIE	1.800	2.100	600
SÉRIE E. — TECHNOLOGIE	2.600	3.000	800

Chaque demande de changement d'adresse doit être accompagnée de **40** fr. en timbres-poste.

Les demandes d'abonnements doivent être adressées au Régisseur des Publications de l'Institut National de la Recherche Agronomique, 149, rue de Grenelle - PARIS-7e. C.C.P. : PARIS, 9064-43. Elles peuvent être également souscrites par l'intermédiaire de libraires dans les conditions habituelles.

TABLE DES MATIÈRES